

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
AHMED ES-SOUNNI

INTERACTION LIPIDE-LIPIDE ET LIPIDE -PROTÉINE DANS LE
MODÈLE DE MONOCOUCHE À L'INTERFACE AIR/EAU.

DÉCEMBRE 1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Résumé

Les interactions entre les composants de la membrane biologique sont étudiées dans le modèle de monocouche à l'interface air/eau. Les propriétés interfaciales sont étudiées pour deux protéines, les cytochromes *c* et *f*, et pour divers lipides synthétiques, comme la dioléoylphosphatidylcholine, la distéaroylphosphatidylcholine et la dioléoylphosphatidylserine, ainsi que pour trois lipides membranaires, la plastoquinone 9, la chlorophylle *a* et le monogalactosyldiacylglycérol. L'étude thermodynamique du système lipide-lipide, en l'occurrence le système chlorophylle *a* -plastoquinone 9, et de divers systèmes lipide-protéine dont le système cyt *c*-DOPC, le système cyt *f*-DOPC, le système cyt *c*-DSPC, le système cyt *c*-DOPS, le système cyt *c*-MGDG, le système cyt *f*-MGDG, et le système cyt *c*-Chl *a* sont également présentées. Les résultats sont analysés à l'aide de la règle d'additivité, la règle des phases en deux dimensions et l'évaluation de l'énergie libre en excès du mélange. L'étude du système Chl *a*-PQ9 montre une miscibilité avec absence d'interaction pour la gamme des fractions molaires utilisées. Cette miscibilité est apparemment complète pour la fraction molaire de PQ9 de 0.1, une fraction molaire comparable à celle rapportée pour la membrane thylacoïdale. Aux fractions molaires de PQ9 supérieures à 0.1, la PQ9 supporte dans les mélanges des pressions de surface de plus en plus faibles, ce qui suggère son éjection de la monocouche pour interagir avec la partie hydrophobe de la Chl *a*. Par contre, à une fraction molaire de PQ9 de 0.1, ce constituant est capable de supporter une pression de surface supérieure à 20 mN/m, une pression comparable à la pression latérale rapportée pour la membrane biologique, soit 20 à 30 mN/m. Les propriétés interfaciales des deux cyt *c* et *f* montrent que ces protéines gardent leur conformation globulaire compacte

formant ainsi une monocouche stable sur un tampon tris millimolaire à $\text{pH} = 8$. Une comparaison entre la section efficace du *cyt c* déterminée par la technique de diffraction des rayons X et son aire moléculaire obtenue en monocouche montre une valeur fort comparable, ce qui indique que la molécule conserve sa structure native à l'interface air-eau. En outre, les cycles compression-expansion montrent que le *cyt f* a une conformation plus compacte et moins sensible que le *cyt c* à la dénaturation et à la désorption de la monocouche. Par ailleurs, lorsque la sous-phase est relativement concentrée en NaCl (0.1 M pour le *cyt c* et 4 M pour le *cyt f*), les deux *cyt* sont soumis à des changements conformationnels intenses manifestés dans de telles conditions par une augmentation de la pression au collapse et de l'aire moléculaire. Ces résultats sont indicatifs de la dénaturation qui affecte les deux protéines. Dans le cas des divers systèmes lipide-protéine, les résultats indiquent une bonne miscibilité seulement en-dessous d'une concentration seuil de la protéine. Lorsque la fraction molaire de la protéine dépasse le seuil de miscibilité, l'apparition de deux collapses sur les isothermes Π -A et ΔV -A indique la non-miscibilité et éventuellement la séparation de phases entre les deux constituants dans le mélange lipide-protéine. En examinant l'état physique du lipide et la charge de son groupement polaire, nous constatons que le seuil de miscibilité de la protéine avec le lipide augmente avec la fluidité, et varie avec la complexité et la charge électrique du groupement polaire du lipide. En outre, l'examen du diagramme de l'énergie libre en excès du mélange en fonction de la fraction molaire de *cyt c*, nous permet de mettre en évidence une interaction entre le *cyt c* et la chlorophylle *a* pour les fractions molaires de *cyt c* inférieures au seuil de miscibilité ainsi qu'entre le *cyt c* et la DOPS dont le groupement polaire est chargé en absence de calcium dans la sous-phase.

Lorsque la fraction molaire de la protéine dépasse le seuil de miscibilité, la protéine forme des agrégats et adopte une conformation dénaturée dans le mélange. Cette hypothèse est vérifiée grâce à la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier appliquée au système *cyt c*-Chl *a* qui indique que lorsque la fraction molaire de *cyt c* dans le mélange est supérieure à 0.1 le spectre FTIR montre un changement conformationnel du *cyt c*, manifesté par une augmentation des structures β par rapport à celles de l'hélice α .

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur R. M. Leblanc pour m'avoir accepté au sein de son équipe et avoir dirigé mon projet de recherche. J'ai souvent apprécié sa patience, son flegme ainsi que son pouvoir de communication.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr. G. Munger pour toute l'aide qu'il a fournie pour l'avancement de ce travail. Également, je suis très reconnaissant au corps administratif du Centre de recherche en photobiophysique ainsi qu'à tous ceux et celles qui ont aidé à la réalisation de ce travail.

Table des matières

	Page
Résumé	ii
Remerciements	v
Table des matières	vi
Abréviations et symboles utilisés	xii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
 1. Introduction	 1
1. 1. La membrane thylacoïdale: siège du processus le plus fondamentale de la vie, la photosynthèse	 1
1. 2. Les constituants de la membrane thylacoïdale	2
1. 2. 1. Les chlorophylles	2
1. 2. 2. Les caroténoides	3
1. 2. 3. Les quinones	3
1. 2. 4. Les autres lipides membranaires	4
1. 2. 5. Les protéines	4
1. 3. Reconstitution membranaire par les systèmes modèles	5
1. 3. 1. Les bicouches	5
1. 3. 2. Les liposomes	8
1. 3. 3. Les films monomoléculaires ou monocouches	8
1. 4. Interaction des composantes en monocouche à l'interface air/eau	 9
1. 4. 1. Interactions lipide-lipide et lipide-protéine par la technique des monocouches	 9
1. 4. 1. 1. Interaction dans les systèmes binaires Chl <i>a</i> -MGDG et Chl <i>a</i> -phytol	 10

1. 4. 1. 2. Interaction Chl <i>a</i> -quinones (Guay et Leblanc, 1987)	11
1. 5. Interaction dans les systèmes lipide-protéine	13
1. 5. 1. Etude des protéines à l'interface air/eau	13
1. 5. 1. 1. Adsorption de la protéine à l'interface air/eau à partir de la sous-phase	14
1. 5. 1. 2. Epandage de la protéine à l'interface air/eau	15
1. 5. 1. 2. 1. Cas du cyt <i>c</i> répandu à l'interface air/eau	17
1. 5. 1. 2. 2. Cas du cyt <i>f</i>	19
1. 5. 2. Interactions lipide-protéine: adsorption de la protéine à la monocouche lipidique à partir de la sous-phase	20
1. 5. 2. 1. Influence de la chaîne grasse du lipide sur l'interaction: interaction hydrophobe	22
1. 5. 2. 2. Influence de la charge sur l'interaction	24
1. 5. 2. 3. Force de l'interaction et miscibilité dans les films lipide-protéine	25
1. 5. 2. 4. Autres conséquences de l'adsorption de la protéine sur le comportement interfacial du film mixte	27
1. 5. 3. Interaction lipide-protéine: épandage des molécules à l'interface air/eau	28
1. 5. 3. 1. Miscibilité dans les films mixtes lipide-protéine	29
1. 5. 3. 2. Paramètres qui influencent l'interaction	29
1. 5. 3. 2. 1. Influence de l'état physique du lipide	30
1. 5. 3. 2. 2. Influence d'autres paramètres	30

1. 6. But de notre travail	30
2. Matériels et méthodes	33
2. 1. Matériels	33
2. 2. Méthodes	35
2. 2. 1. Nettoyage de la verrerie	35
2. 2. 2. Distillation des solvants organiques	36
2. 2. 3. Purification de l'eau et des sels	36
2. 2. 3. 1. Purification de l'eau	37
2. 2. 3. 2. Purification des sels de la sous-phase	38
2. 2. 3. 2. 1. Purification des sels de phosphate	40
2. 2. 3. 2. 2. Purification du chlorure de sodium (NaCl)	40
2. 2. 4. Pureté des molécules utilisées en monocouche	44
2. 2. 4. 1. Pureté de la chlorophylle α	41
2. 2. 4. 2. Purification des autres lipides	41
2. 2. 4. 3. Pureté des protéines	43
2. 3. Technique de fabrication d'une monocouche à l'interface air/eau	44
2. 3. 1. Mesure de la pression de surface (Π)	44
2. 3. 2. Mesure du potentiel de surface (ΔV)	48
2. 3. 3. Epandage des molécules amphiphiles à l'interface air/eau	49
2. 3. 4. Autres techniques utilisées	51
3. Interaction dans les systèmes lipide-lipide et lipide-protéine	52
3. 1. Interaction lipide-lipide	52
3. 1. 1. Etude thermodynamique du système binaire Chl α -PQ3 à l'interface air/eau	54
3. 1. 1. 1 Isothermes Π -A des constituants purs	54

3. 1. 1. 2. Isothermes Π -A des constituants en mélange	54
3. 1. 1. 2. 1. Test de miscibilité par la règle d'additivité	55
3. 1. 1. 2. 2. Test de miscibilité par la règle des phases à deux dimensions	56
3. 1. 1. 2. 3. Test de miscibilité par évaluation de l'énergie libre en excès du mélange ...	56
3. 1. 2. Etude thermodynamique du système binaire Chl α -PQ9 à l'interface air/eau	59
3. 1. 2. 1. Isothermes Π -A et ΔV -A des constituants purs	59
3. 1. 2. 2. Isothermes Π -A et ΔV -A des constituants en mélanges	63
3. 2. Interaction lipide-protéine	70
3. 2. 1. Étude des monocouches des cyt c et f à l'interface air/eau	70
3. 2. 1. 1. Paramètres qui influencent la stabilité des monocouches des cyt c et f	72
3. 2. 1. 1. 1. Influence de la méthode et du solvant d'épandage	72
3. 2. 1. 1. 2. Influence de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes	73
3. 2. 1. 2. Caractérisation des isothermes Π -A et ΔV -A des cyt c et f	78
3. 2. 1. 2. 1. Cas du cyt c	78
3. 2. 1. 2. 2. Cas du cyt f	79
3. 2. 1. 3. Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes des deux cyt	82

3. 2. 1. 4. Tests de dénaturation du cyt <i>c</i> en monocouche	86
3. 2. 1. 5. Conclusion	94
3. 2. 2. Adsorption du cyt <i>c</i> à une monocouche de DOPC	95
3. 2. 3. Interaction lipide-protéine: épandage des deux constituants à l'interface air/eau	100
3. 2. 3. 1. Etude de l'interaction des cyt <i>c</i> et <i>f</i> avec la phosphatidylcholine: influence de l'état physique du lipide	101
3. 2. 3. 1. 1. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPC	102
3. 2. 3. 1. 2. Isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt <i>c</i> -DOPC	104
3. 2. 3. 1. 3. Influence des cycles compression-expansion sur le comportement du mélange cyt <i>c</i> -DOPC	108
3. 2. 3. 1. 4. Isothermes Π -A des mélanges cyt <i>f</i> -DOPC	110
3. 2. 3. 1. 5. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DSPC	112
3. 2. 3. 1. 6. Isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt <i>c</i> -DSPC	114
3. 2. 3. 1. 7. Application de la règle d'additivité aux mélanges cyt-PC	116
3. 2. 3. 2. Etude de l'interaction du cyt <i>c</i> avec la phosphatidylserine: influence du groupe polaire chargé	122

3. 2. 3. 3. Interaction du cyt <i>c</i> avec les lipides	
membranaires	144
3. 2. 3. 3. 1. Cas du système cyt <i>c</i> -MGDG	146
3. 2. 3. 3. 2. Cas du système cyt <i>c</i> -Chl <i>a</i>	150
3. 2. 3. 3. 2. 1. Complexation de la Chl <i>a</i>	
et du cyt <i>c</i> : isothermes Π -A	
des mélanges et spectres	
d'absorption	150
3. 2. 3. 3. 2. 2. Spectres FTIR	162
4. Conclusion	168
5. Références.....	171

Abréviations et symboles utilisés

CCM:	chromatographie sur couche mince
Chl:	chlorophylle
cyt:	cytochrome
DOPC:	dioléoylphosphatidylcholine
DOPS:	dioléoylphosphatidylserine
DSPC:	distéaroylphosphatidylcholine
FTIR:	infrarouge par transformée de Fourier
LB:	Langmuir-Blodgett
MGDG:	monogalactosyldiacylglycérol
PC:	phosphatidylcholine
PQ:	plastoquinone
PS:	phosphatidylserine
PSI:	photosystème I
PSII:	photosystème II
ΔV:	potentiel de surface
ΔV-A:	isotherme de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire
Π:	pression de surface
Π-A:	isotherme de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire

Liste des tableaux

Tableau	Page
1. Travaux antérieures sur les monocouches de cyt <i>c</i> répandu à l'interface air/eau	18
2. Lipides utilisés	34
3. Caractéristiques des différentes sous-phases utilisées	37
4. Comparaison de valeurs déduites des isothermes Π -A de la DOPC entre notre travail et ceux d'autres chercheurs	104
5. Comparaison de valeurs déduites des isothermes Π -A de la DSPC entre notre travail et ceux d'autres chercheurs	114
6. Comparaison des valeurs déduites des isothermes Π -A de la DOPS entre notre travail et ceux d'autres chercheurs	127
7. Comparaison des valeurs déduites des isothermes Π -A du MGDG entre notre travail et ceux d'autres chercheurs	146
8. Variation du seuil de miscibilité du cyt <i>c</i> avec l'état physique et la complexité de la tête polaire de divers lipides	169

Liste des figures

Figure	Page
1. Variation de la pression de surface ($\Delta\Pi$) en fonction de la pression initiale (Π_i) à laquelle la monocouche lipidique est comprimée, après injection du cyt <i>c</i> dans la sous-phase	21
2. Isothermes Π -A de trois phosphatidylcholines de différents états physiques	22
3. Schéma de la cuve de Langmuir	45
4. Vue de profil de la balance de force de Langmuir	47
5. Isothermes Π -A de la PQ3, de la Chl <i>a</i> pure et des mélanges Chl <i>a</i> -PQ3	55
6. L'aire moléculaire du mélange Chl <i>a</i> -PQ3 en fonction de la fraction molaire de Chl <i>a</i>	57
7. Énergie libre de mélange en excès pour le système Chl <i>a</i> -PQ3 en fonction de la fraction molaire de Chl <i>a</i>	58
8. Isothermes Π -A et ΔV -A de la PQ9, de la Chl <i>a</i> et de leurs mélanges	61
9. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la Chl <i>a</i> pour le système Chl <i>a</i> -PQ9	64
10. Variation des deux collapses Π_{c1} et Π_{c2} en fonction de la fraction molaire de la Chl <i>a</i>	65
11. Isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire de la Chl <i>a</i> et des mélanges Chl <i>a</i> -PQ9	67
12. Le potentiel de surface ($\Delta V/n$), exprimé par molécule, représenté en fonction de la fraction molaire en Chl <i>a</i> pour le système chl <i>a</i> -PQ9	69
13. Effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>f</i>	74

14.	Effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>c</i>	76
15.	Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>f</i>	83
16.	Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>c</i>	84
17.	Effet de la durée passée par la monocouche à 0 mN/m sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>c</i>	87
18.	Effet de la concentration du NaCl de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>f</i>	89
19.	Effet de la concentration du NaCl de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>c</i>	90
20.	Représentation schématique du dispositif d'homogénéisation de la protéine injectée sous une monocouche lipidique	97
21.	Adsorption du cyt <i>c</i> injecté dans la sous-phase à une monocouche de DOPC	98
22.	Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPC pure et des mélanges cyt <i>c</i> -DOPC	103
23.	Isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt <i>c</i> -DOPC (suite de la figure 22)	105
24.	Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes Π -A et ΔV -A du mélange cyt <i>c</i> -DOPC ($X_{\text{cyt } c} = 0.034$)	109
25.	Isothermes Π -A de la DOPC pure et des mélanges cyt <i>f</i> -DOPC	111
26.	Isothermes Π -A et ΔV -A de la DSPC pure et des mélanges cyt <i>c</i> -DSPC	113
27.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -DOPC	117
28.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -DSPC	118

29.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>f</i> -DOPC	119
30.	Potentiel de surface représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -DOPC	121
31.	Potentiel de surface représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>f</i> -DOPC	123
32.	Potentiel de surface représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -DSPC	124
33.	Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS pure	125
34.	Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS pure et des mélanges cyt <i>c</i> -DOPS en présence de calcium dans la sous-phase	131
35.	Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS pure et des mélanges cyt <i>c</i> -DOPS en absence de calcium dans la sous-phase	132
36.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -DOPS	134
37.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -DOPS	135
38.	Énergie libre en excès du mélange représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -DOPS, en absence et en présence de calcium dans la sous-phase	137
39.	Shéma du modèle de l'interaction du cyt <i>c</i> avec la DOPS chargée et neutre	143
40.	Isothermes Π -A et ΔV -A du MGDG pure et des mélanges cyt <i>c</i> -MGDG	147
41.	Isothermes Π -A et ΔV -A du MGDG pure et des mélanges cyt <i>f</i> -MGDG	149
42.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt <i>c</i> -MGDG	151
43.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction	

	molaire de la protéine pour le système cyt <i>f</i> -MGDG	152
44.	Spectres d'absorption dans la région du rouge de la Chl <i>a</i> pris dans différentes solutions	153
45.	Isothermes Π -A de la Chl <i>a</i> , du cyt <i>c</i> et de leurs mélanges à différentes fractions molaires de cyt <i>c</i>	155
46.	Isothermes Π -A des mélanges comprimés 15 mn ou deux heures après leur épandage.....	158
47.	L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système c	160
48.	L'énergie libre en excès du mélange représentée en fonction de la fraction molaire du cyt <i>c</i> pour le système cyt <i>c</i> -Chl <i>a</i>	161
49.	Spectres FTIR de la Chl <i>a</i> , du cyt <i>c</i> et des mélanges cyt <i>c</i> -Chl <i>a</i> aux pourcentages molaires de cyt <i>c</i> indiqués	163

1. Introduction

Dans ce chapitre, avant de passer en revue les principaux travaux des deux dernières décennies sur les interactions lipides-protéines employant le modèle de monocouche qui simule la moitié de la membrane biologique, nous aborderons la structure et l'une des fonctions les plus fondamentales de la vie, fonction remplie par la membrane thylacoïdale: la photosynthèse. Nous examinerons également les différents modèles membranaires étudiés de nos jours, notamment celui de la monocouche qui fera l'objet de notre travail.

1. 1. La membrane thylacoïdale: siège du processus le plus fondamentale de la vie, la photosynthèse

En présence de lumière et de chlorophylle, les plantes vertes, les algues et les bactéries photosynthétiques convertissent l'énergie solaire en énergie chimique -emmagasinée sous forme d'hydrates de carbone- indispensable pour la biosynthèse des constituants cellulaires. La photosynthèse est aussi responsable de la régénération de la majeure partie de l'oxygène atmosphérique. La photosynthèse est le bilan de deux types de réactions:

(i) celles qui s'effectuent dans les grana qui forment la partie solide du chloroplaste et où l'énergie lumineuse est utilisée d'une part, pour la photolyse de l'eau, donc la libération de l'oxygène dans l'atmosphère, et d'autre part, pour la fabrication d'un composé réducteur, le NADPH. Au cours de cette dernière étape, un composé riche en énergie, l'ATP est également synthétisé par le processus de photophosphorylation cyclique.

(ii) les autres réactions s'effectuent dans le stroma, partie fluide du chloroplaste. C'est dans cette région que se fixe le CO_2 atmosphérique en présence de NADPH, grâce à l'énergie fournie par l'ATP. Ces réactions se résument ainsi:



La présence dans les cellules végétales d'organites hautement spécialisés tels que les chloroplastes est l'une des principales différences structurales et fonctionnelles entre les cellules animale et végétale. C'est dans ces organites que se trouvent les pigments nécessaires à la photosynthèse. Chez les végétaux supérieurs, cet organite de 3 à 10 μm de forme lenticulaire ou elliptique est entouré par une membrane double (l'enveloppe) qui renferme le stroma où se trouvent les membranes photosynthétiques. Le stroma, représente la phase fluide du chloroplaste où se trouvent les protéines solubles impliquées dans la fixation du CO_2 , les ribosomes, l'ADN ainsi que d'autres inclusions. La partie solide est constituée par les membranes photosynthétiques organisées en petits sacs aplatis: les thylacoïdes. C'est au niveau du thylacoïde que s'effectue la photosynthèse. Les thylacoïdes sont soit isolés dans le stroma pour former les thylacoïdes intergranaires, soit empilés pour former les thylacoïdes granaires. Dans ce dernier cas ces empilements sont appelés des grana.

1. 2. Les constituants de la membrane thylacoïdale

1. 2. 1. Les chlorophylles

Les chlorophylles forment le pigment vert des organismes photosynthétiques. On en distingue au moins huit types, dont la Chl *a* et la Chl *b* qu'on trouve chez les plantes supérieures. Ces chlorophylles ont une structure moléculaire similaire et elles sont constituées d'un noyau porphyrique polaire, à quatre noyaux pyroles liés à un atome de magnésium, et d'une chaîne hydrophobe, le phytol. C'est la tête porphyrique qui donne à la chlorophylle la capacité d'absorber la lumière pour activer le processus photosynthétique. Présente dans toutes les cellules photosynthétiques, la Chl *a* est, sans aucun doute, le pigment photosynthétique le plus important du point de vue structural et fonctionnel (Grumbach, 1983; Hooper, 1984). Bien que la majeure partie des molécules de chlorophylle serve d'antenne pour collecter et transférer l'énergie lumineuse sous forme d'énergie d'excitation, seule une quantité restreinte de

molécules de Chl *a* est capable de piéger cette énergie et la convertir en énergie chimique. Dans la membrane photosynthétique, la majeure partie, sinon la totalité de la chlorophylle est liée de façon non covalente à des protéines pour former des complexes chlorophylle-protéine.

1. 2. 2. Les caroténoïdes

L'importance des caroténoïdes chez les végétaux aussi bien que chez les animaux est largement documentée puisqu'ils représentent l'une des classes de pigments les plus fréquentes dans la nature. L'intérêt de leur étude dans la photosynthèse relève des diverses fonctions qu'ils remplissent dans la membrane du thylacoïde (Isler, 1971; Krinsky, 1971). Ces fonctions sont, d'une part, la photoprotection de la chlorophylle excitée (état triplet) contre la photooxydation et, d'autre part, l'action de ces pigments comme antenne qui absorbe la lumière dans les régions du spectre où la chlorophylle n'est pas efficace, et la transfère sous forme d'énergie d'excitation aux divers états singulets de la chlorophylle (Krinsky, 1971; Moore *et al.*, 1982). Deux types de caroténoïdes entrent dans la composition de la membrane du thylacoïde: les carotènes, principalement le β -carotène et les xanthophylles, principalement la lutéine. Comme pour la chlorophylle, les caroténoïdes sont également complexés aux protéines membranaires.

1. 2. 3. Les quinones

Les quinones jouent un rôle majeure dans la chaîne de transfert d'électrons au niveau du thylacoïde. Le rôle oxydo-réducteur des quinones, principalement la plastoquinone 9, est bien connu dans le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes (Amesz, 1973; Hauska, 1977; Arnon et Tang, 1986; McCauley et Melis 1986).

1. 2. 4. Les autres lipides membranaires

Comme toutes les membranes biologiques, celle du thylacoïde est constituée de protéines et de lipides organisés en bicouche. Les lipides les plus importants en terme de quantité sont les galactolipides: le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Ils représentent de 50 à 80 % des lipides totaux (Nishihara *et al.*, 1980; Hooper, 1984). Le MGDG est prédominant (Gounaris et Barber, 1983; Harwood et Stumpf, 1976; Rawlyer *et al.*, 1987; Siefermann-Harms *et al.*, 1987), et forme avec le DGDG un rapport de 2:1. Les autres lipides sont : (i) les phospholipides (constituants de base des autres types de membranes biologiques), dont le phosphatidylglycérol (PG), et (ii) les sulfolipides, dont le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG). Bien que ces deux types de lipides ne représentent que 20 % des lipides polaires de la membrane du thylacoïde, ils doivent jouer un rôle important puisqu'ils sont les seuls lipides chargés de la membrane. Ils devraient donc être impliqués dans toute interaction électrostatique au niveau de la membrane.

1. 2. 5. Les protéines

Elles constituent environ la moitié du poids de la membrane du thylacoïde. Leur séparation par électrophorèse sur gel, permet de distinguer au moins quatre complexes de protéines ou protéine-chlorophylle, partiellement ou totalement fixés dans la bicouche lipidique: le complexe photosystème I (PSI), le complexe photosystème II (PSII), le complexe cyt b_6/f et le facteur de couplage CF_1-CF_0 (Kaplan et Arntzen, 1982; Allred et Staehelin, 1986). La quasi-totalité de la chlorophylle se trouve dans les PS, dont la distribution est hétérogène à travers les membranes photosynthétiques: surtout dans les thylacoïdes granaires pour le PSII, et dans les thylacoïdes intergranaires pour le PSI (Allred et Staehelin, 1986).

1. 3. Reconstitution membranaire par les systèmes modèles

L'étude des propriétés physiques des systèmes modèles membranaires contribue largement à la compréhension de la structure et des fonctions attribuées aux membranes biologiques. Afin de mimer l'organisation structurale et fonctionnelle de la membrane biologique à l'échelle moléculaire, différentes techniques basées sur des systèmes modèles sont utilisées. Les modèles généralement utilisés sont les bicouches lipidiques, les liposomes, et les monocouches. Ainsi, on peut étudier les propriétés physico-chimiques des membranes reconstituées à partir de lipides purs ou de mélanges constitués de lipides et de protéines.

1. 3. 1. Les bicouches

Le modèle de la bicouche reflète l'identité structurale de la membrane cellulaire, dont la majeure partie est constituée par des lipides. Théoriquement, la bicouche représente deux fois la monocouche lipidique insoluble, telle qu'on peut l'obtenir à l'interface air/eau, où les molécules sont orientées, grâce aux interactions hydrophiles des têtes polaires avec l'eau et hydrophobes entre les chaînes latérales non polaires (Kézdy, 1972). Les membranes lipidiques opaques appelées "Black Lipid Membranes" (BLM), sont des bicouches lipidiques qui couvrent un trou dans une plaque séparant deux compartiments aqueux.

Bien que ce modèle, le premier proposé par Görter et Grendel (1925), offre certaines ressemblances fonctionnelles avec la membrane biologique, comme la capacité électrique et la perméabilité aux solutés lipophiles (Szabo, 1972; Ringsdorf *et al.*, 1988), il néglige la plupart des caractéristiques fonctionnelles d'une membrane naturelle, et ce, probablement parce qu'il ne tient pas compte des protéines, composantes essentielles dans la fonction membranaire, par exemple les perméases et d'autres enzymes (Szabo, 1972).

La présence de protéines dans la membrane biologique, caractérise le modèle de Danielli et Davson, où la bicouche lipidique est encadrée de part et d'autre par une couche protéique (Danielli et Davson, 1935). De plus, afin de concilier structure et fonction, la répartition des protéines dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires, est expliquée par le modèle à mosaïque fluide de Singer et Nicholson (1972). Selon ce modèle, certaines protéines sont liées à la surface chargée de la bicouche lipidique, alors que d'autres la traversent en partie ou en totalité. Les deux caractéristiques importantes de ce modèle sont l'homogénéité et la mobilité de ses composantes, lipides et protéines.

Bien que le modèle de Singer et Nicholson soit celui qui s'approche le plus de la réalité de la membrane biologique, il présente certaines faiblesses. En effet, suite à la quantité importante de travaux publiés sur les modèles membranaires et les membranes biologiques au cours des deux dernières décennies, il est admis que la membrane biologique est inhomogène et que sa fluidité est soumise à des restrictions (Karnovsky *et al.*, 1982; Siegenthaler *et al.*, 1987; Gennis, 1989).

La fluidité de la membrane bien que réelle, ne fait pas intervenir toutes les composantes, spécialement les protéines qui peuvent être fortement influencées par les interactions avec les éléments du cytosquelette (microfilaments et microtubules) du côté intérieur, et les éléments de la matrice extracellulaire du côté extérieur de la cellule (Gennis, 1989).

Les hétérogénéités transversale et latérale, sont à l'origine de l'asymétrie membranaire. Deux exemples démontrent clairement l'asymétrie transversale: (i) dans la bicouche, les protéines intégrales possèdent une orientation transversale donnant à la membrane une asymétrie absolue (Gennis, 1989; Lenaz, 1989); (ii) les travaux sur la composition membranaire ont clairement mis en évidence dans les cas du globule rouge (Gennis, 1989), et du thylacoïde

(Siegenthaler *et al.*, 1987) des différences dans la composition lipidique entre les deux feuillets, interne et externe. Dans les deux cas, bien que le pourcentage des lipides totaux soit le même, celui de chaque type de lipide dans les deux feuillets de la membrane est différent.

L'asymétrie latérale a également fait l'objet de plusieurs travaux qui ont démontré l'existence de domaines protéiques et lipidiques au sein de la membrane. Comme exemple de domaines protéiques, on peut citer ceux de la membrane du thylacoïde dont l'hétérogénéité latérale est clairement mise en évidence au niveau des photosystèmes. Environ 85 % des PSII se trouvent dans les thylacoïdes granaires (empilés) et plus de 85 % des PSI sont localisés dans les thylacoïdes (non empilés) du stroma (Allred et Staehelin, 1986). D'autres domaines de plus grande envergure (macrodomaines) sont mis en évidence dans les membranes cellulaires, par exemple les canaux ioniques à Na⁺ et K⁺ de l'axone de la cellule nerveuse, la structure différenciée de la membrane basale et apicale des cellules épithéliales polarisées, les jonctions cellulaires (zonula et macula), ainsi que les zones à différentes compositions en protéine des membranes du cil connecteur, et des disques du segment externe du bâtonnet rétinien. Dans le cas des lipides, l'hétérogénéité latérale est démontrée par l'existence de microdomaines qui résultent d'une séparation de phases latérales. Bien que ces microdomaines soient souvent rapportés dans les modèles membranaires (Karnovsky *et al.*, 1982; Gennis, 1989), leur présence n'est pas évidente dans les membranes biologiques. Par exemple, on n'a pas pu les isoler et les étudier en tant que microdomaines. Le mieux qu'on ait pu faire a été de mettre en évidence des compositions hétérogènes dans les vésicules ou fragments de membranes isolés (Gennis, 1989). Dans la membrane du thylacoïde, parallèlement à cette hétérogénéité latérale dans la composition en protéine, l'analyse des complexes PSI, PSII, cyt *b₆/f* et facteur de couplage, extraits en tant que complexes lipo-protéiques, a montré une distribution latérale hétérogène du MGDG et du SQDG (Siegenthaler *et al.*, 1987).

1. 3. 2. Les liposomes

Les liposomes (ou vésicules) sont des bicouches lipidiques sphériques qui, par analogie avec les membranes cellulaires, renferment un milieu aqueux. Selon le nombre de bicouches qui les forment, on distingue les liposomes uni- et multilamellaires. Ce type de modèle est largement utilisé dans plusieurs domaines de recherche, tels que les mesures de la perméabilité membranaire, la reconstitution des complexes lipoprotéiques des protéines membranaires actives et le transport des substances chimiques (Ringsdorf *et al.*, 1988; Hoshina et Itoh, 1987).

1. 3. 3. Les films monomoléculaires ou monocouches

Les lipides membranaires sont des molécules amphiphiles constituées d'une région polaire (hydrophile) et d'une région non polaire (ou hydrophobe). L'épandage de telles molécules à l'interface air/eau conduit à la formation d'une monocouche (Gaines, 1966). Ce modèle semble être sans doute, le plus simple pour simuler la membrane. La méthode de Langmuir permet de caractériser une monocouche par les mesures d'isotherme de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (A), et ainsi permet d'obtenir des informations précieuses sur l'orientation et l'emplacement des molécules amphiphiles, informations qu'on ne peut acquérir à l'aide des autres modèles (Ringsdorf *et al.*, 1988). De plus, cette méthode est non seulement très sensible aux faibles changements dans la structure moléculaire, puisqu'elle tient compte de la balance hydrophile/hydrophobe de la molécule, mais elle permet d'étudier des interactions inter-moléculaires tant au niveau de la monocouche qu'entre la monocouche et la sous-phase.

Quant à la technique de Langmuir-Blodgett, elle permet de transférer une ou plusieurs monocouches sur un substrat solide comme le verre, le quartz ou le mica dans le but d'en étudier les propriétés spectroscopiques, électroniques et

microscopiques.

1. 4. Interaction des composantes en monocouche à l'interface air/eau

1. 4. 1. Interactions lipide-lipide et lipide-protéine par la technique des monocouches

La fraction lipidique de la membrane biologique est généralement constituée de plus d'une espèce lipidique, d'où l'intérêt de comprendre les interactions lipide-lipide dans un système binaire. Les interactions lipide-lipide en monocouche mixte sont très largement documentées (Gaines, 1966; Birdi, 1989). Les détails sur la technique de préparation d'une monocouche et les mesures qui s'y rapportent, sont donnés dans le chapitre 2. Deux propriétés sont étudiées dans les monocouches lipidiques mixtes: la miscibilité des constituants dans le film et les interactions intermoléculaires qui sont évaluées par la règle d'additivité et l'énergie libre en excès du mélange (Gaines, 1966).

Un mélange de deux constituants purs est dit idéal lorsqu'il suit la règle d'additivité exprimée par l'équation suivante (Gaines, 1966):

$$A_m^\Pi = x_1 A_1^\Pi + x_2 A_2^\Pi \quad (1)$$

À une pression de surface fixe Π , A_m , A_1 et A_2 sont respectivement les aires moléculaires du mélange et des constituants purs 1 et 2 tandis que x_1 et x_2 sont les fractions molaires de ces constituants. Lorsqu'un mélange est conforme à la règle d'additivité, ses constituants ne sont pas nécessairement miscibles, ils peuvent former des phases séparées. Par contre, toute déviation par rapport à cette loi est la preuve de la miscibilité et de l'existence d'interaction entre les molécules (Gaines, 1966; Kézdy, 1972).

Un autre critère de miscibilité découle de l'application de la règle des phases en deux dimensions (Crisp, 1949; Gaines, 1966) qui prédit que la pression de surface au collapse (Π_c) est indépendante de la composition du film

dans un mélange non miscible, alors qu'elle en est dépendante lorsque les constituants du mélange sont miscibles.

Afin de quantifier l'interaction entre les espèces moléculaires en surface, on évalue l'énergie libre en excès du mélange dans le système binaire à l'interface air/eau à partir de l'équation suivante (Gaines, 1966):

$$\Delta G_m^{E,\Pi} = N_0 \int_0^\Pi (A_m^\Pi - X_1 A_1^\Pi - X_2 A_2^\Pi) \quad (2)$$

où $\Delta G_m^{E,\Pi}$ et N_0 , sont respectivement l'énergie libre en excès du mélange et le nombre d'Avogadro. Toutes les quantités (A et ΔG) sont évaluées graphiquement à partir des isothermes Π - A des constituants purs et des mélanges aux pressions inférieures aux collapses des deux constituants purs.

1. 4. 1. 1. Interactions dans les systèmes binaires Chl *a*-MGDG et Chl *a*-phytol

L'intérêt de l'étude de l'interaction de la Chl *a* avec d'autres molécules du thylacoïde relève de l'existence de plusieurs types d'agrégat de chlorophylle *a*, ainsi que de différentes propriétés spectroscopiques pouvant être produites par interaction entre chlorophylles, Chl et lipide, et Chl et protéine (Bialek-byłka et Wrobel, 1986). *In vitro*, on a montré que la condition thermodynamique la plus stable dans la bicouche lipidique est réalisée lorsque la chaîne phytol de la Chl *a* est associée à la région hydrocarbonée des lipides membranaires et que le noyau porphyrique est situé à la surface de la membrane (Bialek-byłka et Wrobel, 1986).

L'étude thermodynamique des mélanges Chl *a*-MGDG à différentes fractions molaires, a montré que la Chl *a* est miscible avec le MGDG, indépendamment de la composition. Cette miscibilité est justifiée, aussi bien par la variation du collapse des mélanges que par le décalage des valeurs

expérimentales de l'aire moléculaire par rapport à l'aire calculée par la règle d'additivité. De plus, les énergies libres en excès des mélanges sont négatives et montrent bien l'existence d'une interaction entre les deux espèces moléculaires (Tancrède *et al.*, 1982).

Le phytol, molécule comparable à la chaîne latérale de la chlorophylle, possède une moindre polarité que le MGDG. Il possède donc un caractère aliphatique. L'étude thermodynamique du mélange phytol et Chl *a* pourrait aider à comprendre le type d'interaction (polaire ou Van der Waals) observé entre la Chl *a* et le MGDG. Les courbes expérimentales des mélanges Chl *a* -phytol obéissent à la règle d'additivité, ce qui montre ainsi un comportement idéal dans le mélange des deux constituants. Cette observation expérimentale nous conduit à la conclusion qu'il n'existe aucune interaction entre les deux constituants. Cependant, la variation du collapse en fonction de la composition montre une miscibilité entre la Chl *a* et le phytol (Tancrède *et al.*, 1982). Etant donné le caractère polaire du MGDG et de la Chl *a* d'une part, et apolaire du phytol d'autre part, l'existence d'une interaction entre le MGDG et la Chl *a* -manifestée par des ΔG_m négatives-, et son absence entre la Chl *a* et le phytol (mélange idéal), a permis aux auteurs de suggérer que l'interaction entre les molécules de Chl *a* et de MGDG est du type polaire (Tancrède *et al.*, 1982).

1. 4. 1. 2. Interaction Chl *a* -quinones (Guay et Leblanc, 1987)

Les quinones utilisées dans ce travail sont l' α -tocophérylquinone (α -TQ) et les plastoquinones 3 et 9. L'analyse des résultats selon les critères mentionnés ci-dessus (règle d'additivité, règle des phases en deux dimensions et évaluation des énergies libres en excès des mélanges), a montré: (i) la miscibilité entre les deux composantes dans les systèmes Chl *a* - α -TQ, Chl *a* -PQ3 et Chl *a* -PQ9; (ii) l'existence d'une interaction entre la Chl *a* et l' α -TQ et entre la Chl *a* et la PQ3; et (iii) l'absence d'interaction entre la Chl *a* et la PQ9, bien que dans ce dernier cas, uniquement quelques fractions molaires aient été étudiées (Guay et

Leblanc, 1987).

Les molécules de vitamine K1, d' α -TQ, de phytol et de Chl *a* ont le même groupe hydrophobe. Si la condensation dans les films des mélanges Chl *a* -vitamine K1 (Gaines *et al.*, 1965) et Chl *a* - α -TQ (Guay et Leblanc, 1987) est due à une accommodation géométrique entre les molécules, on pourrait s'attendre à ce que les mélanges Chl *a* -phytol (voir ci-dessus) présentent aussi une déviation négative par rapport à la règle d'additivité. Ceci n'étant pas le cas, on pourrait donc relier l'interaction à la nature chimique des têtes polaires (Guay et Leblanc, 1987). Cette interaction est donc expliquée par le caractère quinonique de ces molécules (α -TQ et vitamine K1). Il en est de même pour l'interaction Chl *a* -PQ3 bien que dans ce cas, la PQ3 avec sa chaîne hydrophobe différente, contient des groupements C=O qui pourraient également interagir avec la Chl *a* (Guay et Leblanc, 1987).

Dans le cas du système Chl *a* -PQ9, on pense que l'absence d'interaction est due à la longueur excessive du groupe hydrophobe de la PQ9 (45 carbones) qui interagirait avec la partie hydrophobe de la Chl *a* d'une manière différente que ne le ferait une molécule à courte chaîne telle que la PQ3, la vitamine K1 ou l' α -TQ (Guay et Leblanc, 1987). Bien que la PQ9 impliquée dans cette étude, soit la seule plastoquinone présente dans la membrane du thylacoïde, son étude détaillée dans les mélanges avec la Chl *a* a été omise, probablement à cause de son instabilité en monocouche ainsi que de sa faible pression de surface au collapse (De Costa *et al.*, 1972; Guay et Leblanc, 1987). Uniquement quelques fractions molaires ont été étudiées et l'existence de deux collapses (aux faibles fractions molaires de Chl *a*), dont un, le plus bas, variant avec la composition, a été attribué à l'éjection de la PQ9 du film mixte (Guay et Leblanc, 1987). La présence de deux collapses est probablement la preuve de l'immiscibilité entre les deux constituants lorsque la PQ9 est majoritaire dans la monocouche. On sait que la PQ9 occupe dans la membrane du thylacoïde une fraction molaire de

0.1 à 0.2 par rapport à la chlorophylle (Grumbach, 1983; Hooper, 1984), par conséquent, afin de mieux comprendre son comportement avec celui de la Chl *a* en monocouche mixte à l'interface azote/eau, nous croyons en l'importance de tester les mélanges à plusieurs fractions molaires, notamment ceux existant dans la membrane du thylacoïde. D'autre part, l'éventuelle éjection de la PQ9 du film mixte PQ9-Chl *a* aux fortes concentrations en PQ9 (Guay et Leblanc, 1987) et à des pressions de surface relativement faibles, serait la preuve que, dans ces conditions, la PQ9 ne supporte pas des pressions latérales comparables à celles des membranes biologiques, soit de l'ordre de 35 mN/m.

1.5 . Interaction dans les systèmes lipide-protéine

1.5.1. Etude des protéines à l'interface air/eau

Les molécules protéiques sont des copolymères d'une vingtaine d'acides aminés différents, d'hydrophobicité variable. Elles sont donc amphiphiles et à haute activité de surface. La plupart des protéines sont globulaires. On admet que la structure tridimensionnelle d'une protéine native dans son milieu physiologique, est celle où l'énergie libre de Gibbs du système est la plus basse. Cela signifie que la conformation native est déterminée, d'une part, par les interactions intramoléculaires, et d'autre part, par les interactions de la protéine avec son environnement (Phillips, 1977; Norde, 1986). Sitôt la biosynthèse d'une protéine achevée, elle adopte sa structure native. La séquence d'acides aminés forme sa structure primaire. La chaîne polypeptidique est courbée en adoptant une structure secondaire, conduisant à la formation d'éléments ordonnés tels que les hélices- α et les feuillets- β , dont la stabilité est assurée grâce aux liens hydrogènes des groupements amides et carbonyles des squelettes polypeptidiques. En outre, le repliement de la chaîne et la juxtaposition des éléments secondaires aboutissent à la structure tertiaire de la protéine. Pour les protéines ayant plus d'un polypeptide à structures secondaires et tertiaires bien définies, la structure quaternaire décrit la manière dont ces

polypeptides sont combinés (Phillips, 1977). Compte tenu de l'importance des protéines dans la composition et les fonctions des membranes cellulaires, il s'est avéré nécessaire d'étudier les interactions de ces macromolécules dans des systèmes modèles comme celui de la monocouche.

Deux sortes d'études en monocouche sont généralement rapportées sur les protéines à l'interface air/eau: (i) l'adsorption de la protéine à l'interface air/eau à partir de la sous-phase, et (ii) l'épandage d'une solution protéique à la surface.

1. 5. 1. 1. Adsorption de la protéine à l'interface air/eau à partir de la sous-phase

En solution, la plupart des protéines, notamment celles impliquées dans les fonctions enzymatiques, immunologiques ou de transport, sont globulaires (Phillips, 1977; Norde, 1986). Sous cette configuration native, l'énergie libre du système est minimale. Les résidus non polaires (hydrophobes) sont enfouis à l'intérieur, hors de contact avec l'eau, tandis que les résidus polaires, établissent des ponts hydrogènes avec les molécules d'eau. Quand les molécules atteignent la surface par diffusion, elles rencontrent un nouvel environnement énergétique. Ce phénomène -connu sous le terme d'adsorption de la protéine-, conduit à une modification de l'énergie libre du système à l'interface, où l'aire interfaciale de haute énergie occupée par les molécules d'eau, est remplacée par les chaînes périphériques non polaires de la protéine. Le processus d'adsorption se fait en trois étapes: (i) la diffusion de la protéine de la sous-phase dans la région immédiatement sous la surface, (ii) la pénétration de la protéine à l'interface (l'adsorption), et (iii) le réarrangement conformationnel des molécules adsorbées (Norde, 1986; De Feijer et Benjamins, 1987). Ainsi, à la surface, le dépliement de la protéine qui prend une conformation bidimensionnelle conduit à une distribution de la protéine en segments, généralement connus sous le nom de trains situés à l'interface, et de queues et boucles dirigées vers les phases adjacentes de telle sorte que les résidus non polaires soient orientés vers la

phase aérienne, et les résidus polaires vers la phase aqueuse (Phillips, 1977; MacRitchie, 1981; Norde, 1986). Ce processus de dépliement de la protéine une fois adsorbée à la surface, est connu sous le terme de "dénaturation de surface" due aux changements irréversibles que la surface provoque sur la protéine. Il en résulte une perte de la structure secondaire et tertiaire de la protéine, qui devient très flexible et adopte une conformation enroulée de façon aléatoire.

Les études rapportées sur l'adsorption de la protéine à l'interface air/eau, concernent généralement l'augmentation de pression de surface (Π) et/ou de la concentration interfaciale en fonction du temps (Graham et Phillips, 1979; Davies *et al.*, 1983; De Feijer et Benjamins, 1987). La concentration interfaciale est déterminée à l'aide de la radioactivité de surface après marquage d'un acide aminé par un élément radioactif. D'autres mesures concernent l'augmentation de la pression de surface en fonction de la concentration du substrat en protéine (Phillips, 1977). L'état d'équilibre de l'adsorption de la protéine obtenu à une pression de surface maximale constante, varie d'une protéine à l'autre, et peut prendre plusieurs heures, voire plusieurs dizaines d'heures (Graham et Phillips, 1979; Davies *et al.*, 1983).

Généralement, les cinétiques d'adsorption des protéines montrent que l'adsorption se fait en deux phases: (i) au départ, lorsque la concentration interfaciale est quasi nulle, l'adsorption est régie par la diffusion, mais (ii) aux grandes concentrations de surface (concentrations proches de l'état d'équilibre), l'adsorption est limitée par une barrière d'énergie (Graham et Phillips, 1979) liée à la pénétration des molécules protéiques dans l'interface et à leur subséquent réarrangement conformationnel (Phillips, 1977; Graham et Phillips, 1979).

1. 5. 1. 2. Epandage de la protéine à l'interface air/eau

Contrairement aux molécules lipidiques à faible poids moléculaire,

généralement solubles dans le benzène et formant une monocouche stable, les macromolécules protéiques sont plus complexes, étant donnée la structure complexe et unique de chaque molécule. Bien que de nombreuses protéines soient solubles en solutions aqueuses, elles peuvent être quantitativement répandues aux interfaces air/phase aqueuse ou huile/phase aqueuse, et donner des monocouches insolubles hautement stables (MacRitchie, 1986). Cette grande stabilité due à leur caractère amphiphile, dépend beaucoup de l'état du substrat (sous-phase). En effet, la plupart des protéines ne peuvent être répandues sur de l'eau pure sans perte d'une certaine quantité dans la sous-phase. Afin de minimiser ces pertes, il est essentiel de contrôler certains paramètres comme la méthode d'épandage (Trurnit, 1960), le choix du solvant d'épandage, la quantité optimale à déposer (environ 0.5 mg/m^2) ainsi que sa concentration en solution (environ 0.03 % p:v) (Kashiwagi, 1958; Davies *et al.*, 1983; MacRitchie, 1986). La sous-phase doit être concentrée en sel afin d'avoir une force ionique appropriée et rendre la protéine insoluble à l'interface (Kashiwagi, 1958; Quinn et Dawson, 1969; Davies *et al.*, 1983, 1984; Fidelio *et al.*, 1984). De plus, comme les protéines portant une charge électrique, il est nécessaire qu'elles soient répandues par l'entremise d'un solvant et sur une sous-phase à pH proche de leur point isoélectrique. Cela permet de réduire la barrière énergétique électrique (MacRitchie, 1986). Tout changement dans les conditions que nous venons d'énumérer peut conduire à des variations appréciables dans les isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire.

Comme dans le cas de l'adsorption à partir d'une sous-phase aqueuse, la protéine déposée à l'interface, est étalée de telle sorte que les segments polaires restent plongés dans l'eau, alors que les segments apolaires sont dirigés vers la phase aérienne. Bien que cette situation évoque une structure partiellement ou totalement dénaturée, elle offre l'avantage de pouvoir insérer -grâce aux segments hydrophobes- la protéine dans une monocouche lipidique, afin de la

comparer à un système biologique.

Une protéine totalement étalée à l'interface air/eau occupe souvent une aire moléculaire de $1\text{ m}^2/\text{mg}$ (Kashiwagi, 1959; MacRitchie, 1986; Krebs *et al.*, 1988). Dans ces conditions, ses structures secondaire et tertiaire sont affectées, provoquant ainsi sa dénaturation. Ceci est souvent le cas pour les molécules flexibles, telles que la β -caséine dont les pourcentages en hélice- α et les liens disulfures sont faibles. Cependant, les protéines globulaires peuvent conserver en partie ou en totalité leur structure native, si bien que les films qui en résultent à l'interface air/eau, sont concentrés, c'est-à-dire occupent moins de $1\text{ m}^2/\text{mg}$ (Kézdy, 1972; Taneva *et al.*, 1984; MacRitchie, 1986).

1. 5. 1. 2. 1. Cas du cyt *c* répandu à l'interface air/eau

L'étude du cyt *c* à l'interface air/eau a montré qu'indépendamment de la méthode utilisée, par adsorption de la sous-phase ou épandage à la surface à partir de cristaux ou à partir d'une solution, les isothermes Π -A et ΔV -A obtenues sont de forme identique (Lamarche, 1988). Ceci voudrait dire que la conformation du cyt *c* à l'interface air/eau, est la même, que la protéine soit adsorbée ou répandue à la surface. Ce même phénomène a été observé chez d'autres protéines, où les propriétés interfaciales restent inchangées, que leur monocouche soit formée à partir de la surface ou de la sous-phase (Pilon *et al.*, 1987; Krebs *et al.*, 1988).

Les propriétés interfaciales du cyt *c* étudiées par différents chercheurs sont résumées dans le tableau 1. Les résultats montrent une concordance entre les isothermes Π -A de Quinn et Dawson (1970) et de Lamarche (1988). Par contre, celles obtenues par Chin et Brody (1975), sont décalées vers les plus faibles aires moléculaires bien que le contraire devrait se produire, puisque la protéine est répandue sur un substrat plus concentré en sel. D'ailleurs, l'épandage du cyt *c* sur un substrat concentré en NaCl (tableau 1), a donné une isotherme plus

expansée (Quinn et Dawson, 1970). Dans ce cas, cette augmentation de l'aire moléculaire serait due, soit à une plus grande rétention de la protéine à la

Tableau 1. Travaux antérieurs sur les monocouches de cytochrome *c* répandu à l'interface air/eau.

Référence	Aire (\AA^2 par molécule) extrapolée à 0 mN/m	Pression au collapse (mN/m)	Substrat
1	-	9-10	Tampon phosphate 10 mM , pH: 7.8
2	750	12-13	Tampon phosphate 40 mM + 150 mM NaCl, pH: 7.4
3	380	-	Tampon phosphate 50 mM + 0.3 M NaCl, pH: 7
4	222	9	Tampon phosphate, force ionique: 0.6, pH: 7.8, température: 15 °C
5	740	9	Tampon Tris-HCl 1 mM, pH: 8

1. Aghion et al. (1969).
2. Quinn et Dawson (1970).
3. Reinach et Brody (1972).
4. Chin et Brody (1975).
5. Lamarche et al. (1988b).

surface à cause de la plus grande force ionique du substrat, soit à l'adoption d'une conformation plus relâchée provoquée par l'effet dénaturant du sel sur la protéine. La solubilisation de la protéine dans la sous-phase, est mise en évidence par les mesures de la concentration interfaciale à l'aide de la méthode de la radioactivité de surface. Dans le cas de la glycophorine, protéine

membranaire de l'érythrocyte. l'étude quantitative a montré que l'aire moléculaire diminue lorsqu'on augmente la quantité de protéine initialement déposée (Davies *et al.*, 1983). En outre, les mesures de la concentration du cyt *c* évaluées par radioactivité de surface ont permis d'estimer que 25 % des molécules initialement déposées se sont solubilisées dans la sous-phase (Lamarche, 1988).

1. 5. 1. 2. 2. Cas du cyt *f*

Le cyt *f* fait partie du complexe cyt b_6/f dont la fonction est bien établie dans le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes, particulièrement entre le "pool" de plastoquinone et la plastocyanine (Hurt et Hauska, 1981; Willms *et al.*, 1987). Sa purification à partir de la membrane du thylacoïde de plusieurs espèces (Gray, 1978; Ho et Krogmann, 1980; Willey *et al.*, 1984), a conduit ultérieurement à la détermination de sa structure primaire chez le pois et l'épinard (Willey *et al.*, 1984; Adam et Malkin, 1989). Contrairement au cyt *c*, dont la configuration spatiale est très bien connue, celle du cyt *f* est encore obscure à cause de l'absence de sa forme cristalline. L'analyse de la séquence d'acides aminés (285 résidus) suggère que le cyt *f* soit formé de trois portions: (i) une portion globulaire incluant le N-terminal et le groupement hème, située du côté intra-thylacoïdal (1-250), (ii) une portion transmembranaire très hydrophobe (251-270) et, (iii) une portion portant le C-terminal du côté du stroma. A cause de sa portion transmembranaire, le cyt *f* forme des agrégats (oligomères) en milieux aqueux. Cependant, le cyt *f* de plus faible poids moléculaire, extrait à l'état monomérique et soluble dans l'eau (sans formation d'agrégats), pourrait être dépourvu de son domaine transmembranaire (Willey *et al.*, 1984).

Jusqu'à présent, une seule étude a été rapportée sur les monocouches du cyt *f* à l'interface air/eau (Chin et Brody, 1975). Contrairement au cyt *c* dont les isothermes Π -A ressemblent à celles généralement rapportées pour les

protéines, c'est-à-dire à forme sigmoïde et un collapse bien défini (Quinn et Dawson, 1970; Lamarche, 1988), le *cyt f* dont l'isotherme présente une pression de surface non nulle aux grandes aires moléculaires, ne révèle pas de collapse bien défini mais plutôt un arrêt de compression à 10 mN/m.

1. 5. 2. Interactions lipide-protéine: adsorption de la protéine à la monocouche lipidique à partir de la sous-phase

Ce genre d'étude concerne la majorité des travaux rapportés sur les interactions lipide-protéine à l'interface air/eau. Les protéines, généralement solubles dans l'eau, sont injectées dans la sous-phase au-dessous d'une monocouche lipidique, préalablement comprimée à une pression de surface initiale Π_i . Les mesures concernent les variations de l'aire moléculaire ΔA ($\Delta A = A_{\text{final}} - A_{\text{initial}}$), à pression constante, ou bien les variations de pression de surface $\Delta \Pi$ ($\Delta \Pi = \Pi_{\text{final}} - \Pi_{\text{initial}}$) à aire moléculaire constante comme c'est souvent le cas. L'augmentation de l'un ou de l'autre de ces paramètres, est interprétée comme la preuve de la pénétration de la protéine dans le film lipidique (Quinn et Dawson, 1969, 1970; Morse II et Deamer, 1973; Verger et Pattus, 1982; Lamarche, 1988). Cependant, on a montré que la protéine peut s'adsorber à la monocouche lipidique sans y pénétrer, c'est-à-dire sans causer de variation de Π ou de A des molécules lipidiques (Teissie, 1981).

Les résultats des cinétiques d'incorporation de la protéine au film lipidique sont présentés de la même façon que ceux de l'adsorption de la protéine à l'interface air/eau. Les paramètres, $\Delta \Pi$ mesuré à l'équilibre, et la vitesse initiale d'augmentation de la pression de surface $d\Pi/dt$, déterminent l'affinité de la protéine pour le lipide (Quinn et Dawson, 1969 a, b, 1970; Morse II et Deamer, 1973). Ainsi, la figure 1 montre que le *cyt c* a plus d'affinité pour s'incorporer à une monocouche de cardiolipine que de lécithine (Quinn et Dawson, 1969b). Une propriété générale concernant l'incorporation de la protéine, est la linéarité

entre $\Delta\Pi$ et Π_i , dont l'extrapolation de la droite à $\Delta\Pi = 0$ mN/m, détermine la

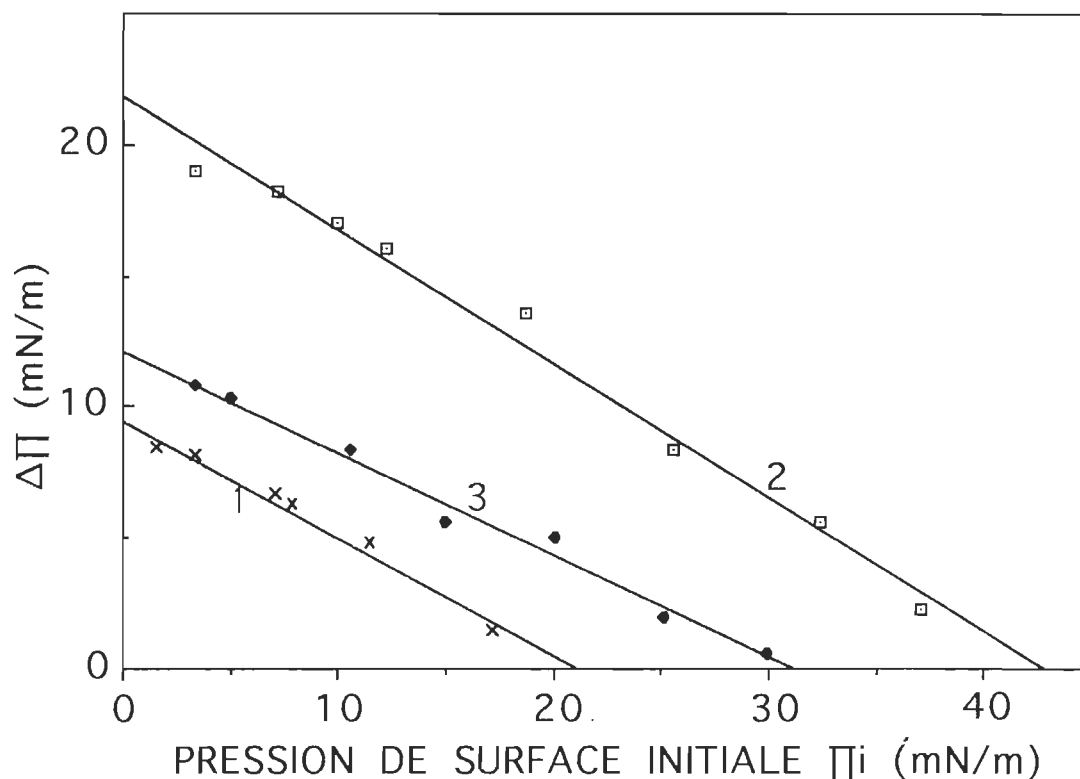


Fig. 1. Variation de la pression de surface ($\Delta\Pi$) en fonction de la pression initiale (Π_i) à laquelle la monocouche lipidique est comprimée, après injection du cytochrome c dans la sous-phase. La sous-phase contient 10 mM de NaCl pour la PC d'oeuf (1) et la cardiolipine (2), et 1 M de NaCl pour la cardiolipine (3). Ces données sont tirées du travail de Quinn et Dawson (1969b).

capacité relative de pénétration de la protéine dans la monocouche lipidique (Fig. 1). Celle-ci peut être influencée par divers paramètres dont: (i) la longueur et surtout le degré d'insaturation de la chaîne aliphatique du lipide et, (ii) la charge de la protéine et de la tête polaire du lipide. L'effet du pH et de la force ionique du substrat sont également deux facteurs dont l'influence est liée au caractère électrostatique de l'interaction.

1. 5. 2. 1. Influence de la chaîne grasse du lipide sur l'interaction: interaction hydrophobe

Deux propriétés de la chaîne peuvent influencer l'interaction lipide-protéine: sa longueur et son degré d'insaturation (nombre de doubles liaisons). Un lipide dont les chaînes grasses sont riches en doubles liaisons (ou insaturées), comme la PC d'oeuf (Fig. 2), est caractérisé par une monocouche

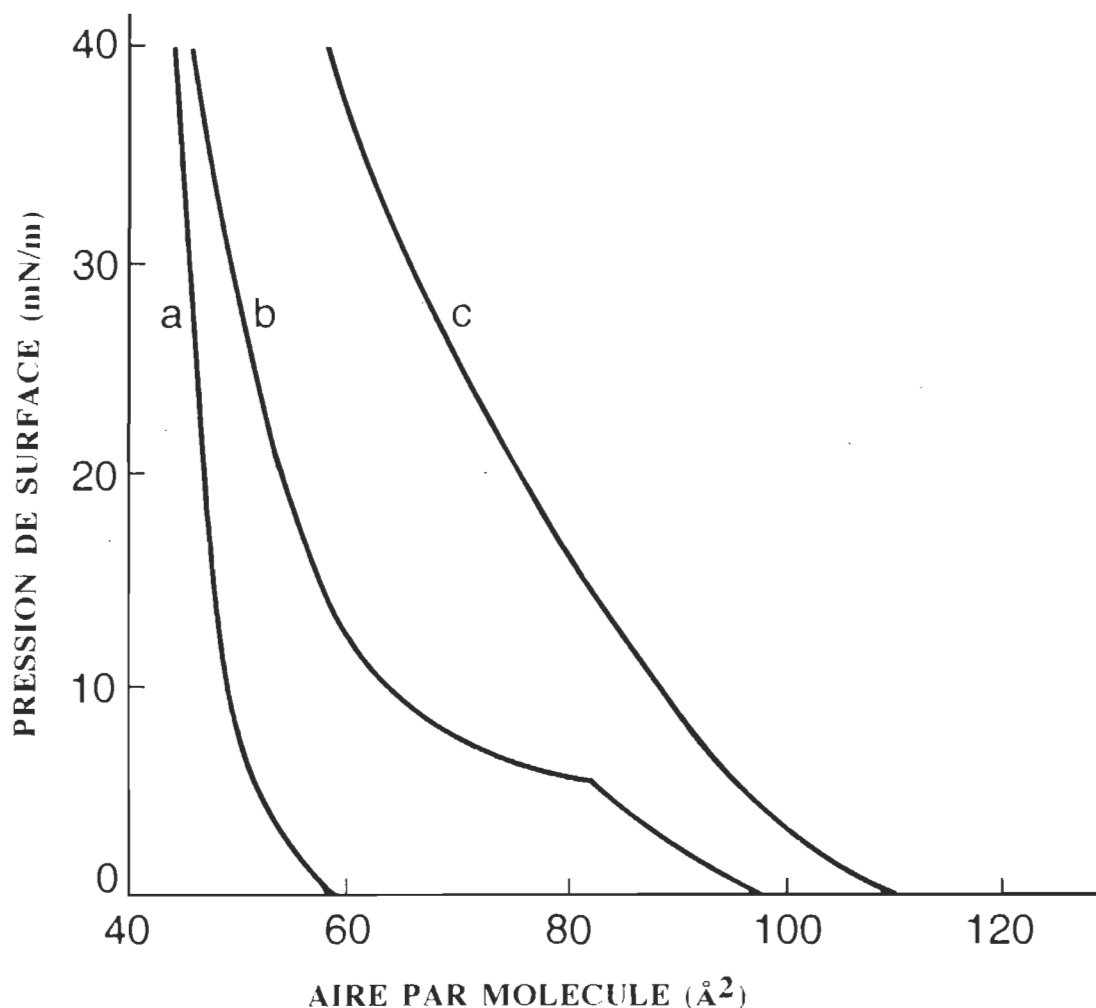


Fig. 2. Isothermes Π -A de trois phosphatidylcholines de différents états physiques: a, la DBPC ($C_{22:0}$); b, la DMPC ($C_{14:0}$) et c, la PC d'oeuf. (D'après Phillips *et al.*, 1975).

fluide à grande compressibilité. Par contre, un lipide dont les chaînes grasses sont totalement saturées, comme la dibéhénoyl-phosphatidylcholine (DBPC), donne une monocouche à l'état solide ou condensée, à faible compressibilité.

D'autres lipides saturés comme la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), peuvent exister, à la température ambiante et en fonction de la pression de surface à laquelle ils sont comprimés dans les deux états, fluide et solide, avec une transition de phase (Fig. 2).

L'influence de la longueur de la chaîne est peu étudiée dans l'interaction. On peut citer deux exemples où la protéine est incorporée à des films lipidiques de différentes longueurs de chaîne. L'adsorption de l'apocyt *c* (cyt *c* amputé de son groupement hème), à des monocouches de PS de différentes longueurs de chaîne a montré plus d'interaction avec les lipides de plus courtes chaînes (Pilon *et al.*, 1987). Cependant, Wilkinson *et al.* (1986) ont observé un effet contraire pour le cyt *b*₅ (protéine membranaire), dont l'interaction avec la PC, est de plus en plus forte avec les lipides de plus longues chaînes hydrocarbonées. Dans ce dernier cas, l'augmentation de $\Delta\Pi$ est appuyée par les mesures de l'augmentation de la concentration interfaciale de la protéine dans les films lipidiques à plus longues chaînes.

L'incompatibilité entre ces deux résultats peut être expliquée par les hypothèses suivantes: (i) Dans le cas de la PS, on a ignoré l'influence de la charge de la tête polaire sur l'interaction. (ii) Les mesures sont observées à des pressions de surface initiales différentes: 20-35 mN/m dans le cas de la PS, et 0.1 mN/m dans le cas de la PC. Dans ce dernier cas, certaines PC se trouvent dans un état physique expansé, alors que d'autres se présentent dans un état condensé. (iii) Dans tous les cas de mélanges PC-cyt *b*₅, la mesure de la radioactivité interfaciale, prise à la seule pression de surface de 40 mN/m, n'a pas été directe, mais déduite d'une seule mesure, prise sur les monocouches déposées sur un substrat solide, par la technique LB. En fait, les mesures de $\Delta\Pi$ sont prises à 0.1 mN/m et l'incorporation de la protéine à cette pression ou à 40 mN/m, n'est probablement pas la même, à cause de la différence entre l'état physique de certaines PC étudiées. Par exemple, la DMPC, la DPPC et la

DOPC sont fluides aux faibles pressions de surface. De plus, la protéine est probablement éjectée du film lipidique aux pressions de surface élevées.

L'état physique, expansé-condensé, influencé par les paramètres cités ci-dessus, est souvent relié à l'ampleur de l'interaction lipide-protéine. Ainsi, dans le cas de l'apocyt *c* (Pilon *et al.*, 1987) et du cyt *c* (Morse II et Deamer, 1973), ce sont les lipides les plus insaturés (donc les plus expansés) qui montrent les plus grandes augmentations de $\Delta\Pi$. Dans le cas de lipide à transition de phase, comme l'acide dimyristoylphosphatidylcholine (DMPA), le cyt *c* est préférentiellement réparti dans la phase expansée plutôt que dans la phase solide (Peschke et Möhwald, 1987).

1. 5. 2. 2. Influence de la charge sur l'interaction

Puisque certains acides aminés d'une protéine globulaire sont chargés, celle-ci porte une charge nette aux pH situés de part et d'autre du point isoélectrique. De telles protéines s'adsorbent fortement aux films lipidiques de charge opposée. Ce type d'interaction dite électrostatique, est très bien démontré dans le cas du cyt *c* et de son apoprotéine où on a mis en évidence une plus grande incorporation en présence des lipides chargés négativement, comme la cardiolipine et la PS, plutôt qu'en présence des lipides neutres comme la PC (Quinn et Dawson, 1969a, b; Morse II et Deamer, 1973; Teissie, 1981; Pilon *et al.*, 1987). Par exemple, la figure 1, montre bien que la capacité de pénétration du cyt *c* dans le film lipidique est plus grande pour la cardiolipine que pour la PC d'oeuf. De plus, en comprimant à des pressions de surface relativement grandes, le cyt *c* est désorbé des monocouches de lipide neutre, et non des monocouches des lipides chargés négativement (Quinn et Dawson, 1969a, b).

Lorsque la protéine est chargée négativement, on note une interaction électrostatique importante avec les lipides de charge positive. Un tel exemple

est rapporté dans le cas de l'adsorption de l'insuline (hormone pancréatique chargée négativement) à divers films lipidiques chargés ou neutres. Dans cette étude, l'interaction maximale a lieu avec les lipides chargés positivement (Kozarac *et al.*, 1988).

Le caractère électrostatique de l'interaction peut être mis en évidence en variant le pH ou la concentration ionique de la sous-phase. C'est aux pH où la protéine porte une charge nette, soit négative dans le cas de l'insuline, soit positive dans le cas de l'apocyt *c*, que la plus grande interaction avec les lipides chargés est détectée (Pilon *et al.*, 1987; Kozarac *et al.*, 1988). Lorsque l'interaction ne résulte pas d'une attraction électrostatique (par ex. à un pH où l'une ou l'autre composante est neutre, ou bien les deux sont chargées et de même signe), l'augmentation de $\Delta\Pi$ en fonction de Π_i est interprétée comme une conséquence d'une interaction hydrophobe (Kozarac *et al.*, 1988).

La force ionique de la sous-phase est également un paramètre utilisé pour confirmer la nature électrostatique de l'interaction. Ainsi, l'adsorption du cyt *c* n'est pas modifiée par l'ajout de NaCl (1 M) dans la sous-phase, sous un film de PC neutre (Quinn et Dawson 1969b). Par contre, lorsque le film lipidique est chargé négativement, l'ajout de sel à grande concentration provoque une grande diminution de l'adsorption de l'apocyt *c* ou du cyt *c* à la monocouche (Quinn et Dawson, 1969; Pilon *et al.*, 1987)

1. 5. 2. 3. Force de l'interaction et miscibilité dans les films lipide-protéine

Dans les sections précédentes, nous avons montré que l'adsorption de la protéine, mesurée par l'augmentation de $\Delta\Pi$ est la preuve de sa pénétration dans la monocouche lipidique. Cependant, ce paramètre ($\Delta\Pi$) ne peut être utilisé pour quantifier, ni la concentration interfaciale de la protéine adsorbée (Verger et Pattus, 1982; Wilkinson *et al.*, 1986), ni son énergie d'interaction avec le lipide (Morse II et Deamer, 1973). Ces deux quantités sont respectivement

évaluées grâce à la radioactivité de surface et l'application de l'équation de la règle d'additivité (équation 1). En effet, en connaissant la concentration interfaciale en protéine, on peut évaluer l'énergie d'interaction à partir des courbes Π -A des deux constituants car, tout comme le lipide, la protéine peut se comporter comme une monocouche insoluble à l'interface air/eau, aux pressions de surface inférieures à son collapse (MacRitchie, 1986; Norde, 1986). L'évaluation d'un tel paramètre n'a de valeur que si les constituants sont miscibles dans la monocouche mixte. Malheureusement, dans ce genre d'étude, d'une part, le terme "interaction", souvent utilisé pour déterminer l'adsorption de la protéine à une monocouche lipidique est impropre parce qu'il est plutôt qualitatif que quantitatif et, d'autre part, la miscibilité dans le film mixte est ignorée.

Récemment, Lamarche *et al.* (1988a, b) ont abordé la force d'interaction d'une protéine adsorbée à une monocouche lipidique en utilisant une approche plutôt dynamique que cinétique. Après injection et homogénéisation du cyt *c* sous une monocouche de PC 18:1, de Chl *a*, ou de phéophytine *a* (Phé *a*), comprimée à 20 mN/m, un ou plusieurs cycles expansion-compression ont pu être faits, afin d'étudier l'interaction entre les deux constituants. Ainsi, les conclusions suivantes ont été proposées: (i) Dans le cas des systèmes Chl *a* -cyt *c* ou Phé *a* -cyt *c*, seule l'expansion initiale est suffisante pour incorporer de façon irréversible une quantité de protéine à la monocouche. Cette interaction est qualifiée de forte puisque la protéine demeure fortement stabilisée dans le film mixte -qui ne montre pas d'hystérèse- lorsqu'il est soumis à des cycles expansion-compression supplémentaires (Lamarche *et al.*, 1988b). (ii) Dans le cas du système PC 18:1-cyt *c*, l'incorporation de la protéine est régie par la pression de surface. Après plusieurs cycles expansion-compression, allant de 30 mN/m à des pressions de surface graduellement inférieures à 8.5 mN/m, on a pu constater à chaque cycle supplémentaire, un accroissement de l'incorporation du cyt *c* entre 0 et 14 mN/m et une désorption de la protéine

de la monocouche du mélange entre 14 et 20 mN/m. Au delà de 20 mN/m, toute compression supplémentaire a servi à comprimer le film lipidique. Ce résultat est en accord avec les travaux de Quinn et Dawson (1969b), montrant que la pénétration du cyt *c* dans une monocouche de PC d'oeuf, initialement comprimée à une pression de surface de 20 mN/m est nulle. Cette incorporation du cyt *c* à une monocouche de PC 18:1 qui est réversible et qui dépend de la pression de surface, est qualifiée d'interaction faible (Lamarche *et al.*, 1988a, b).

(iii) Dans les systèmes étudiés, l'interaction faible est expliquée par un caractère hydrophobe, c'est-à-dire que l'incorporation de la protéine dans la monocouche lipidique dépend de l'orientation des chaînes grasses de la PC (Lamarche 1988; Lamarche *et al.*, 1988a). Par contre, l'interaction forte est attribuée au caractère polaire des deux constituants qui est expliquée par l'intervention des groupements C=O et Mg de la chlorophylle *a* d'une part, et C=O et N-H des acides aminés de la protéine d'autre part (Lamarche, 1988).

1. 5. 2. 4. Autres conséquences de l'adsorption de la protéine sur le comportement interfacial du film mixte

Bien que la technique utilisée dans le processus d'adsorption de la protéine à la monocouche lipidique soit simple, elle présente des inconvénients: (i) L'équilibre d'adsorption de la protéine peut prendre de longues périodes, allant jusqu'à des heures ou même des dizaines d'heures. Dans de telles conditions, on ne peut éviter la dénaturation de la protéine (Graham et Phillips, 1979; Wilkinson *et al.*, 1986; Heckl *et al.*, 1987), ainsi que son passage dans le compartiment de référence, et ce, malgré l'installation d'une barrière au-dessous du flotteur. Il en résulte une contre-pression qui fausserait la pression de surface. (ii) L'évaluation de la concentration interfaciale de la protéine est souvent déterminée par radioactivité de surface, qui reste de nos jours la technique la plus efficace. Cependant, cette mesure est limitée puisque le système détecte également la contribution des radiations β provenant d'une

profondeur de 300 μm sous la monocouche (Phillips et Krebs, 1986; Krebs *et al.*, 1988). Par exemple, on a démontré par radioactivité de surface que le cytochrome c peut s'adsorber à une monocouche lipidique comprimée à 20 mN/m, sans y pénétrer (c'est-à-dire sans modifier sa pression de surface) (Teissie, 1981). De plus, l'augmentation continue de la radioactivité de surface, avant et après l'état d'équilibre, est la preuve de cette adsorption de la protéine à la monocouche lipidique sans modification de sa pression de surface (Graham et Phillips, 1979a; Lamarche, 1988). Dans ces cas où la fraction molaire protéique dans le film mixte est imprécise, il est difficile de déterminer l'énergie d'interaction entre les deux constituants. (iii) Dans ce genre d'étude, la miscibilité dans le film mixte n'est pas prise en considération. En effet, il existe une concentration critique en protéine au-dessus de laquelle il y aurait séparation de phases (voir section 1.5.3.1.).

1. 5. 3. Interaction lipide-protéine: épandage des molécules à l'interface air/eau

Une membrane biologique comme celle du thylacoïde est constituée -en poids- de 50 % de lipides et 50 % de protéines. En considérant un poids moléculaire moyen de 30 000 Da pour les protéines, et 800 Da pour les lipides, cette membrane contiendrait seulement 2-3 molécules de protéine pour 100 molécules de lipide. En utilisant le même principe pour diverses membranes cellulaires, on a estimé que le rapport molaire protéine/lipide pourrait varier entre 1/60 et 1/100 (Gennis, 1989). De telles valeurs, montrent que dans la bicouche cellulaire, les protéines interagissent avec les lipides en très faible fraction molaire, soit de l'ordre de quelques unités pour cent. Puisque les protéines peuvent former une monocouche insoluble et stable à l'interface air/eau, il est possible de les mélanger dans une monocouche lipidique, à partir d'une solution d'épandage. Une telle méthodologie offre l'avantage d'étudier l'interaction lipide-protéine aux fractions molaires désirées, notamment celle

existant *in vivo*, une condition expérimentale qu'on ne peut réaliser si la protéine est adsorbée à partir de la sous-phase (voir section 1. 5. 2). Les résultats sont généralement analysés selon les règles conventionnelles appliquées aux mélanges de lipides: soit la règle d'additivité, l'évaluation de l'énergie libre en excès du mélange, et la règle des phases en deux dimensions. La formation du film mixte peut se faire, soit en mélangeant les deux constituants en solution (MacRitchie, 1986; Maget-Dana *et al.*, 1989), soit en les étalant à l'interface l'un après l'autre, s'ils ne sont pas solubles dans le même solvant (Chin et Brody, 1976; Davies *et al.*, 1984; Fidelio *et al.*, 1984; Taneva *et al.*, 1984; Heckl et Möhwald, 1987; Heckl *et al.*, 1987).

1. 5. 3. 1. Miscibilité dans les films mixtes lipide-protéine

La miscibilité est l'un des objectifs visés dans l'étude des monocouches mixtes. L'interaction entre deux espèces moléculaires ne peut être prise en considération si celles-ci forment des phases séparées. Parmi les critères utilisés dans la recherche de la miscibilité, notons l'étude du collapse du mélange. L'existence de deux collapses dans les films mixtes est attribuée à la non miscibilité dans les mélanges (Gaines, 1966; Gabrielli *et al.*, 1981; Fidelio *et al.*, 1987). Ainsi, en étudiant l'interaction dans les systèmes lipide-protéine, Fidelio et coll. ont constaté l'existence d'une concentration critique en protéine, au-dessus de laquelle les courbes Π -A des mélanges présentent deux collapses. Cette concentration critique est définie comme le seuil de miscibilité, au-dessus duquel, il y a séparation de phases (Fidelio *et al.*, 1984, 1986, 1987).

1. 5. 3. 2. Paramètres qui influencent l'interaction

Comme la technique d'adsorption de la protéine de la sous-phase à une monocouche lipidique est la plus connue et la plus utilisée (MacRitchie, 1986; Norde, 1986), l'influence de divers paramètres sur l'interaction lipide-protéine est largement explorée. Cependant, ce n'est que récemment que la technique de

mélange lipide-protéine à l'interface commence à prendre de la popularité. Donc, les travaux qui montrent l'influence des différents paramètres sur l'interaction sont encore restreints.

1. 5. 3. 2. 1. Influence de l'état physique du lipide

L'état physique du film lipidique est l'un des paramètres qui affectent l'incorporation de la protéine. Ainsi, l'étude de l'interaction de diverses protéines, hydrosolubles ou membranaires, avec plusieurs lipides à monocouche condensée ou expansée, a clairement démontré que la protéine est mieux solubilisée dans les films lipidiques dont l'isotherme est expansée, ou dans la phase fluide s'il s'agit de lipides à transition de phase (Fidelio *et al.*, 1986; Heckl *et al.*, 1985a, 1985b; Heckl et Möhwald, 1987; Heckl *et al.*, 1987). De plus, ces résultats sont appuyés par l'observation au microscope électronique à transmission de monocouches mixtes (lipide-protéine) qui a montré que les films sont homogènes lorsque l'état physique du lipide est expansé, mais forment des phases séparées si le lipide est condensé (Cornell et Carroll, 1985).

1. 5. 3. 2. 2. Influence d'autres paramètres

La complexité de la tête polaire est un autre paramètre rapporté dans l'interaction lipide-protéine. En utilisant plusieurs lipides, Fidelio *et al.* (1984, 1986) ont montré que le seuil de miscibilité ainsi que la valeur absolue de l'énergie libre d'interaction (ΔG_m^Π qui est négative), augmentent avec la complexité de la tête polaire du lipide.

Jusqu'à présent, l'effet de la charge sur l'interaction est encore inexploré. Une telle étude serait d'un grand intérêt puisque la couche interne de la membrane biologique est chargée négativement.

1. 6. But de notre travail

Notre objectif est d'étudier les interactions lipide-lipide et lipide-protéine

par une même méthodologie, soit celle de l'épandage de deux constituants pris séparément, soit celle de leur mélange à l'interface air/eau. Ainsi, la miscibilité et l'interaction peuvent être évaluées de façon quantitative pour les deux systèmes. À la lumière des travaux présentés ci-dessus, dans le cadre de la revue de la littérature concernant les études classiques faites sur l'interaction lipide-protéine, où les molécules protéiques sont adsorbées à partir de la sous-phase, nous nous sommes rendus compte d'un certain nombre d'inconvénients reliés à cette technique. Étant donné la différence énorme entre les poids moléculaires des lipides et des protéines, l'un de ces inconvénients est l'absence de contrôle quantitatif de l'incorporation de la protéine à la monocouche lipidique, problème qui peut conduire à une séparation de phase dans un système où la majeure partie de la monocouche est occupée par la protéine. En effet, la reconstitution membranaire ou les études qui visent à comparer les interactions lipide-protéine dans un système modèle, doivent tenir compte du fait que, *in vivo* une membrane biologique contient très peu de protéines en terme de fraction molaire. Et bien que plusieurs études aient montré que la membrane biologique puisse contenir des microdomaines lipidiques et protéiques, la séparation de phase macroscopique causée par l'excès de protéine dans une monocouche mixte lipide-protéine, rend difficile la comparaison d'un tel modèle avec la membrane cellulaire. Cependant, malgré l'éventuelle représentation excessive de la protéine dans les systèmes mixtes rapportés antérieurement, beaucoup de travaux ont montré l'affinité préférentielle de la protéine à certaines propriétés du lipide, comme par exemple la charge de la tête polaire ou l'état physique influencé par le degré d'insaturation de la chaîne grasse.

Dans le cadre de l'interaction lipide-lipide, nous nous proposons d'étudier le système Chl *a* -plastoquinone 3 et Chl *a* -plastoquinone 9. Ce dernier système binaire est fort important à titre de système biomimétique car il agit probablement comme l'accepteur primaire d'électron dans la chaîne de transfert

d'électrons photosynthétique.

Les propriétés interfaciales des protéines en monocouche sont souvent rapportées dans des conditions dénaturantes. Comme ces molécules complexes forment des monocouches très peu stables à l'interface air/eau, on a souvent négligé de tenir compte de tous les paramètres qui peuvent influencer la stabilité de ces monocouches. Dans un premier temps, on se propose de caractériser les monocouches stables de *cyt c* et *cyt f*. Cette étape est très importante puisque, contrairement aux études d'adsorption d'une protéine à une monocouche lipidique, l'étude thermodynamique des mélanges lipide-protéine à l'interface air/eau, ne peut avoir une crédibilité quantitative que si les isothermes Π -A et ΔV -A des constituants purs représentent celles où la totalité de leurs molécules est prise en considération. Puisqu'il est essentiel de travailler avec une protéine native, nous comparerons ses isothermes avec celles de la protéine dénaturée au préalable. Cela nous aidera à déterminer si la protéine incorporée dans le système mixte qu'on se propose d'étudier est affectée ou non par la dénaturation de surface.

L'étape suivante concerne la miscibilité et l'interaction de ces protéines avec certains lipides. Deux groupes de lipides sont choisis, d'une part, les lipides membranaires tels que la Chl *a* et le MGDG, et d'autre part, les phospholipides dont la DOPC, la DSPC et la DOPS. Ces derniers étant des lipides synthétiques ils ont fait l'objet d'une multitude de travaux sur les modèles membranaires, à cause de la diversité de leur tête polaire et de leur chaîne d'acide gras. Ainsi, pour la PC on peut étudier l'influence de l'état physique du film lipidique par le choix de sa chaîne grasse, soit insaturée donnant un film fluide (DOPC), soit saturée donnant un film de type gel (DSPC). Par ailleurs, on peut étudier l'effet de la charge de la tête polaire du lipide par l'ajout d'ions calcium dans la sous-phase, qui, dans le cas de la DOPS provoquent la neutralisation de sa charge.

2. Matériels et méthodes

2. 1. Matériels

Les lipides utilisés (Tableau 2) sont la Chl *a*, les plastoquinones 3 et 9, et le MGDG comme constituants de la membrane photosynthétique d'une part, et les phospholipides, l'un chargé, les autres neutres, comme constituants de toute membrane biologique. La Chl *a* est extraite et purifiée à partir de feuilles d'orge ou d'épinard selon la méthode décrite par Omata et Murata (1980). Le MGDG est également extrait et purifié dans notre laboratoire par la méthode de chromatographie liquide à haute performance décrite par Gallant et Leblanc (1991). Le pourcentage des chaînes grasses indiqué en appendice au Tableau 2 est déterminé par chromatographie en phase gazeuse. Les plastoquinones 3 et 9 gracieusement fournies par la compagnie Hoffman LaRoche (Basle, Switzerland), se sont avérées légèrement contaminées. Elles ont par conséquent nécessité une purification par chromatographie sur couche mince (voir ci-dessous). Les autres phospholipides (Tableau 2), achetés aux compagnies SIGMA Chemicals Co. (St. Louis, MO) et AVANTI Polar Lipids Inc. (Birmingham, AL), et dont la pureté a été analysée par chromatographie sur couche mince et par chromatographie en phase gazeuse, n'ont révélé aucun indice d'impureté.

Les protéines utilisées sont les cyt *c* (type VI) et *f*, achetées à la compagnie SIGMA Chemicals Co. (St. Louis, MO), le premier d'origine animale (extrait du coeur de cheval) et le second d'origine végétale (extrait de navet). Le cyt *c* qui contient 4.5 % d'eau en poids, et dont le poids moléculaire est de 12 384 daltons, est reçu sous forme de poudre en lots de 100 mg, tandis que le cyt *f* dont le poids moléculaire est de 29 100

Daltons (Gray, 1978), est obtenu en lots de 5 mg, chacun dans une solution de tampon phosphate de sodium (20 mM, pH: 7.5). Le degré de pureté de la

Tableau 2. Lipides utilisés.

Lipide	Poids moléculaire g/mol	Origine
DOPC (C _{18:1}) ^a	785	AVANTI
DOPS (C _{18:1}) ^{a, b}	831.98	AVANTI
DSPC (C _{18:0}) ^{a, c}	790.2	SIGMA
Chl <i>a</i>	893.54	Extraite et purifiée dans notre laboratoire
MGDG ^d	778.98	Extrait et purifié dans notre laboratoire
PQ 3	337	Gracieuseté de Hoffman LaRoche
PQ 9	748	Gracieuseté de Hoffman LaRoche

- a: Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de carbone et celui de doubles liaisons dans la chaîne aliphatique.
- b: Seul lipide qui porte une charge négative sur son groupement polaire.
- c: Seul lipide solubilisé dans un mélange hexane:éthanol (9:1, v:v), tous les autres lipides sont solubilisés dans le benzène.
- d: L'analyse des chaînes d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse a donné la composition lipidique suivante: C_{16:0} (4.8 %), C_{18:1} (3.4 %), C_{18:2} (11.4 %) et C_{18:3} (80.2 %).

protéine a été évalué par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). L'analyse par densitométrie a montré par la présence d'une seule bande, l'absence de toute impureté. Tel que souligné dans le chapitre 1, le cyt *f* est obtenu en absence de sa portion

hydrophobe qui permet de le fixer dans la membrane du thylacoïde, si bien qu'en solution aqueuse, il ne s'agrège pas et reste donc à l'état monomère (Willey *et al.*, 1984). Pour les deux cyt, le solvant d'épandage consiste en un mélange éthanol:eau, 2:1 (v:v).

Avant utilisation, tous ces produits sont conservés dans un congélateur à une température de -135°C dans des contenants hermétiquement fermés, sous atmosphère d'argon. Après chacune des expériences en monocouche, l'échantillon puisé à partir de ces stocks et mis en solution dans le solvant approprié et remis à une température de -20°C , et ce, pendant toute la durée d'utilisation qui est de 24 à 48 heures.

2. 2. Méthodes

Puisque les techniques de chimie de surface sont très sensibles aux impuretés, toutes les substances utilisées à cette fin, incluant les solvants d'épandage, ainsi que l'eau et les sels constituant le substrat de la monocouche, doivent être d'un haut degré de pureté. De plus, tout objet destiné à être en contact avec ces produits, notamment la verrerie, la cuve Langmuir et le matériel chromatographique, doit être d'une propreté extrême.

2. 2. 1. Nettoyage de la verrerie

Toute la verrerie est nettoyée selon la même méthode. Les cellules et les lames de quartz utilisées pour la mesure des spectres d'absorption sont trempés dans l'acide sulfochromique pendant quelques jours, tandis que les autres éléments (béchers, tubes, pipettes Pasteur, fioles, seringues, etc...) sont trempés pendant quelques heures dans l'acide sulfurique. La première étape consiste à solubiliser un sachet de Nochromix (Godax Laboratories

Inc., New York, N. Y.) dans quatre litres d'acide sulfurique. La solution initialement trouble est gardée au repos pendant la nuit jusqu'à obtention d'un état limpide. Elle est ensuite versée dans les éléments à nettoyer. L'étape suivante consiste à rincer les éléments 10 fois à l'eau de robinet et 10 fois à l'eau filtrée (voir purification de l'eau), puis, ils sont remplis ou trempés dans une solution de NaOH à un pH d'environ 12 et ce, afin de neutraliser les traces d'acide. La vaisselle est ensuite rincée, 10 fois à l'eau de robinet, 10 fois à l'eau filtrée et 3 fois à l'eau bidistillée, puis séchée (couverte de papier aluminium) dans une étuve à 70 °C. Finalement, la verrerie est rangée dans une armoire à l'abri de la poussière et de l'humidité, les fioles sont remplies d'argon et fermées à l'aide de capuchons préalablement nettoyés, alors que les autres éléments sont tout simplement enfermés dans un emballage en plastique.

2. 2. 2. Distillation des solvants organiques

Chaque solvant organique est distillé dans un système approprié. Pour s'assurer de leur pureté, on a utilisé deux tests. Le premier consiste à évaporer 5 ml jusqu'à un volume résiduel de 100 μ l dont l'évaporation à sec et la pesée dans une cupule à l'aide d'une électrobalance devrait donner un poids nul à l'erreur expérimentale près. Le second consiste à tremper cette même cupule -ayant servi au premier test- dans 100 à 200 μ l de solvant organique, la solution ainsi préparée est déposée à l'interface air/eau afin de détecter s'il y a ou non des substances tensio-actives tel que décrit dans la section suivante.

2. 2. 3. Purification de l'eau et des sels

Le substrat ou sous-phase sur lequel on répand les monocouches est constitué d'un tampon phosphate, Tris seul, ou Tris additionné de sel

(voir Tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques des différentes sous-phases utilisées.

Nature de la sous-phase	Origine du sel (Compagnie)	Concentration et pH
Tampon phosphate	ACP	10^{-3} M, pH: 8
Tampon Tris-HCl	SIGMA	10^{-3} M, pH: 8
Tampon Tris-HCl + NaCl	NaCl: SIGMA	Tris-HCl: 10^{-3} M, NaCl: 0.1 à 4 M, pH: 8
Tampon Tris-HCl + CaCl_2	CaCl_2 : SIGMA	Tris-HCl: 10^{-3} M, CaCl_2 : 10^{-3} à 10^{-2} M, pH: 8

2. 2. 3. 1. Purification de l'eau

La procédure de purification de l'eau consiste en deux étapes. L'eau provenant du réseau hydraulique de la ville est d'abord passée à travers un système Nanopore (Sybron - Barnstead, Boston, MA) à quatre filtres. Le premier élimine la matière organique, les deux suivants retiennent les ions, et le quatrième élimine les particules dont la section dépasse $0.2 \mu\text{m}$. L'eau ainsi filtrée, ayant une résistivité de l'ordre de $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ (ce qui correspond à 3×10^{-3} particules de NaCl par million), est ensuite distillée deux fois dans un système en quartz (modèle Bi-18, Quartschmelze GMBH, Allemagne de l'Ouest). Après distillation, cette eau pure dont la tension superficielle est de $71.0 \pm 0.5 \text{ mN/m}$, mesure déterminée par la méthode de Nouy, est récupérée dans des bouteilles en verre propres, avant d'être utilisée à la préparation de la sous-phase dans les 24 heures qui suivent.

2. 2. 3. 2. Purification des sels de la sous-phase

Souvent, pour les monocouches, le substrat sur lequel on étale le film est un tampon ou une solution de sel de force ionique parfois relativement élevée. Le degré de pureté de 99 % et plus, attribué par les compagnies à ces sels est toutefois insuffisant pour leur utilisation sans purification supplémentaire puisque nous y avons détecté la présence de substances tensio-actives en quantité substantielle. De tels surfactants peuvent fausser les mesures des paramètres physiques d'une monocouche de molécules pures ou en mélange.

Les impuretés de l'eau et des sels de la sous-phase ont été détectées par des mesures de la tension superficielle, dont les valeurs sont comparées avec les valeurs standards rapportées dans le "CRC Handbook of Chemistry and Physics, 67th edition, 1986-1987". Une autre technique souvent utilisée, consiste à comprimer la surface "propre" de la cuve, et mesurer dans les mêmes conditions qu'en présence d'une monocouche, les paramètres physiques tels que la pression et le potentiel de surface s'il y a lieu. Ce test qu'on peut appeler "test blanc à compression lente" (c'est-à-dire lorsque la barrière mobile est entraînée à la vitesse d'une expérience normale), peut s'appliquer également dans la détection des impuretés dans les solvants organiques ou dans le produit de nettoyage du gel de silice d'une plaque à chromatographie sur couche mince.

Un autre test que nous avons mis au point et qu'on peut appeler "test blanc à compression rapide" s'est avéré plus sensible et plus efficace puisqu'il détecte des impuretés là où le test précédent n'en montre pas. La méthode consiste à balayer par un mouvement rapide de la barrière mobile de Teflon, la surface de la cuve jusqu'à 1 ou 2 cm du flotteur afin de

détecter s'il y a lieu -par le moyen du détecteur de pression de surface (voir plus loin)- la présence de substances tensio-actives. Pour ce faire, 30 minutes après avoir rempli la cuve de Langmuir avec de l'eau pure ou un tampon, un balayage rapide et une première mesure de pression de surface, sont suivis du nettoyage de la surface à l'aide d'une pipette Pasteur reliée à un système à succion à vide. Cette opération est ensuite répétée toutes les 30 minutes sur une période de 4 heures, temps requis pour certaines de nos expériences. Après la première compression, des pressions de surface de 10 à 20 mN/m pour l'eau pure et le tampon Tris, et de 20 à 30 mN/m pour le tampon phosphate et la solution de NaCl (10^{-3} mol.l⁻¹), ont été détectées. Après les compressions subséquentes, on note encore des pressions de surface de 10 mN/m et plus pour les phosphates et le NaCl, mais seulement de l'ordre de 0 à 2 mN/m pour le Tris et l'eau pure. Par conséquent, nous avons jugé nécessaire de purifier les sels de phosphate et de chlorure de sodium. De plus, dans le cas où le balayage de la surface de l'eau pure, à la vitesse de 2 cm/minute, n'a révélé aucun signal de pression de surface, la recompression rapide sur cette même surface non nettoyée, a donné une pression de 16 mN/m. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les impuretés tensio-actives provenant de la sous-phase pourraient avoir une pression de collapse très faible -non détectable par notre système de mesure- si bien que celles-ci se désorbent continuellement dans la sous-phase. Ceci est justifié par le fait que, lorsqu'on arrête la barrière après compression rapide et détection d'une certaine pression de surface, celle-ci chute à 0 mN/m en très peu de temps. Malgré que ces impuretés ne donnent pas de pression de surface stable, leur adsorption à une monocouche de molécules pures ou en mélange peut fausser de façon significative les mesures de ces paramètres physiques, surtout aux pressions de surface relativement faibles. C'est pourquoi, il est nécessaire qu'en monocouche, le

substrat soit extrêmement propre.

2. 2. 3. 2. 1. Purification des sels de phosphate

Le phosphate monobasique étant utilisé en faible quantité ou remplacé par l'acide chlorhydrique pour l'ajustement du pH, seul le phosphate dibasique (Na_2HPO_4) est concerné par cette purification. Pour ce faire, dans un bécher, 100 g de sel couvert par 200 ml de chloroforme ont été agités pendant 15 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. On a ensuite laissé reposer pendant 5 minutes avant de décanter le chloroforme, grâce à une pipette Pasteur reliée à une pompe à vide. L'opération est réitérée six fois, ensuite le sel est séché sous vide, puis stocké à sec ou en solution aqueuse.

2. 2. 3. 2. 2. Purification du chlorure de sodium (NaCl)

Parmi les techniques essayées à cette fin (cf. Lamarche, 1988), la plus efficace que nous avons choisie, est le lavage au chloroforme. Dans une ampoule à décantation, on verse 1 litre d'eau distillée saturée en sel (environ 280 g/l), puis 200 ml de chloroforme. On agite manuellement pendant une ou deux minutes afin de permettre au chloroforme de dissoudre les impuretés. Après 15 minutes de repos, on distingue deux phases complètement séparées: en haut, la solution de sel et en bas, le chloroforme avec les impuretés concentrées à l'interface, qu'on élimine facilement par écoulement de la phase chloroformique. L'opération est répétée cinq fois, ensuite on porte la solution saline à ébullition pendant 15 minutes afin de se débarrasser du chloroforme résiduel et du complexe azéotrope, CHCl_3 : H_2O , dont le point d'ébullition est de 56.1°C . Cette solution dont la concentration est déterminée par l'indice de réfraction grâce à un réfractomètre (modèle ABBE-3L, BAUSCH & LOMB Inc., New York,

NY). est ensuite conservée dans une bouteille propre à température ambiante.

2. 2. 4. Pureté des molécules utilisées en monocouche

2. 2. 4. 1. Pureté de la chlorophylle *a*

L'extraction, la purification et les tests de pureté de la Chl *a* ont été réalisés dans nos laboratoires par M. Gaétan Munger d'après la méthode décrite par Omata et Murata (1980). Utilisant des plaques GF (GF, Analtech, Mandel Sci. Copy, ON) et un solvant de migration composé d'un mélange hexane:acétone 7:3 (v:v), la chlorophylle *a* donne une seule tache, dont le R_f est de 0.43. Les autres espèces qui pourraient l'accompagner sont la Chl *a'* et la phéophytine *a* ayant un R_f respectif de 0.45 et de 0.50. Un autre critère permettant de juger de la pureté de la Chl *a* est sa courbe de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire. Plusieurs tests chromatographiques ont permis de constater que la Chl *a* pure donne, à 20 mN/m, une aire moléculaire de $93.5 \pm 3.5 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$.

2. 2. 4. 2. Purification des autres lipides

Puisque les tests chromatographiques n'ont pas révélé d'impuretés, les phospholipides sont utilisés sans purification préalable. Par contre, les plastoquinones (PQ) 9 et surtout 3, plus contaminées ont nécessité avant leur utilisation une purification telle que rapportée par Guay et Leblanc (1987). Cette purification utilise la méthode de chromatographie sur couche mince. Les plaques utilisées à cette fin sont des plaques de silice (GF, Analtech, Mandel Sci. Copy, ON) de $25 \times 25 \text{ cm}^2$, dont l'adsorbant est une couche de silice de 0.25 mm d'épaisseur. Pour éliminer toute trace de substances tensio-actives, les plaques sont d'abord nettoyées dans un

mélange méthanol:chloroforme 1:1 (v:v) pendant au moins deux jours, puis activées dans une étuve à 100 °C pendant 4 heures. A ce stade, elles peuvent être entreposées dans une chambre à migration, dont le fond est couvert par un produit dessicant et ce, pendant toute la durée précédant leur utilisation. Immédiatement avant utilisation, les plaques sont remises à 100 °C pendant 15 minutes. Pour chaque purification, environ 3 mg de PQ sont solubilisés dans du benzène à une concentration de l'ordre de $3 \cdot 10^{-2}$ M. À une distance de un cm de chaque bord latéral et à un cm du bas de la plaque, on dépose environ 12 "spots", contenant chacun au maximum 200 µg de PQ. Ces spots dont le diamètre ne dépasse pas 3 mm sont espacés d'environ 1 cm. Cette opération ainsi que toutes celles qui suivent sont achevées sous atmosphère d'argon. De même pour les solvants, ils sont saturés d'argon, par barbotage à l'aide d'une pipette Pasteur, 3 à 5 minutes avant le début de l'expérience. Après déposition, la plaque est ensuite mise dans une chambre à migration dont le fond est recouvert de chloroforme. Celle-ci, est également saturée de vapeurs de chloroforme, à l'aide d'un papier filtre couvrant ses parois internes. La chambre doit être saturée d'argon et la surface libre du chloroforme doit être en-dessous de "la ligne des spots" de quinone afin d'éviter toute perte de molécules dans le solvant. La migration du chloroforme vers le haut de la plaque entraîne également les molécules déposées qui seront séparées les unes des autres selon leur affinité pour l'adsorbant et le solvant utilisés. Dans ces conditions, la nature de chaque produit sera caractérisée par son R_f qui représente le rapport entre sa vitesse de migration et celle du solvant. La migration est arrêtée lorsque le front du solvant atteint une distance approximative de 4 cm du bord supérieur de la couche de silice. Il n'est pas nécessaire d'utiliser de révélateur pour visualiser la quinone, identifiable par sa couleur jaune. Le R_f de la PQ3 et de la PQ9 sont respectivement de 0.82 et de 0.87, valeurs

comparables à celles de 0.85 et de 0.9 rapportées par Guay et Leblanc (1987). La bande de silice où se situe la quinone est grattée et récupérée dans un tube à centrifugation contenant environ 10 ml de chloroforme. Parallèlement et dans les mêmes conditions, à partir d'une plaque propre, une bande de silice d'emplacement identique est également grattée et servira comme expérience de contrôle (test blanc).

Une centrifugation de 10 minutes est nécessaire. Nous avons utilisé une centrifugeuse de laboratoire (modèle Sorval RC 5, de la compagnie Dupont) à une vitesse de 8 000 g. Le surnageant est récupéré et évaporé à sec sous vide. La plastoquinone ainsi purifiée est solubilisée dans 200 μ l de benzène, puis évaporée goutte-à-goutte dans une cupule à peser, sous une atmosphère d'azote ou d'argon. La quinone pesée sous vide grâce à une électrobalance (modèle RG 2 000, Ventron Instrument Corp., CA) est immédiatement utilisée pour les expériences de monocouche.

Afin de réaliser le test blanc visant à déterminer la présence ou non de substances tensio-actives dans les plaques de silice propres, la bande de silice grattée subit le même traitement que celle où logeait la quinone. Après évaporation du surnageant à sec, sa pesée n'a jamais donné de valeurs supérieures à 6 μ g, une valeur comparable à l'erreur expérimentale de lecture sur l'électrobalance, soit 5 μ g. De plus, après épandage de l'échantillon à l'interface air/eau, le balayage rapide de la surface après évaporation du solvant n'a pas permis de détecter de pression de surface. Ces mêmes tests de contrôle ont été appliqués sur les solvants organiques distillés.

2. 2. 4. 3. Pureté des protéines

Les cyt *c* et *f* sont utilisés sans autre purification. Comme mentionné

auparavant, l'absence d'impuretés est vérifiée par électrophorèse. Par ailleurs, les échantillons puisés dans les stocks des deux protéines ont donné des isothermes Π -A et ΔV -A très stables et très reproductibles aussi longtemps qu'ils sont conservés à -20°C ou -135°C .

2. 3. Technique de fabrication d'une monocouche à l'interface air/eau

2. 3. 1. Mesure de la pression de surface (Π)

L'épandage de molécules lipidiques amphiphiles dissoutes dans un solvant approprié, sur une surface propre d'eau ou de tampon conduit à la formation d'une monocouche insoluble. En comprimant la monocouche grâce à une barrière mobile, on est amené à diminuer la surface occupée par chaque molécule. Ainsi, la monocouche initialement répandue dans un état expansé, sera condensée en une structure 2-D ordonnée. Progressivement, les molécules seront orientées, la partie polaire ou hydrophile dans l'eau, et la partie non polaire ou hydrophobe, généralement une chaîne hydrocarbonée, dans l'air. Simultanément, une pression mesurable exercée par la monocouche est détectée par un système de mesure approprié. Cette pression qu'exercent les molécules les unes sur les autres dans la monocouche et qu'on compare à la pression latérale dans les membranes biologiques (Verger et Pattus, 1982), est appelée pression de surface, une quantité physique rendue mesurable à l'aide d'un bassin conçu par Irving Langmuir et connu sous le nom de "Cuve de Langmuir" (Fig. 3).

La surface intérieure de la cuve est entièrement recouverte par un Teflon hydrophobe dont la propreté est régulièrement entretenue. Les cuves utilisées dans cette étude sont de $50.00 \times 14.03 \times 1.50 \text{ cm}^3$ et $40.80 \times 14.73 \times 1.00 \text{ cm}^3$, et reposent chacune sur une table antivibration en granite, stabilisée grâce à quatre coussins pneumatiques. Par l'intermédiaire d'un

flotteur mobile en mica relié aux deux bords de la cuve par deux feuilles de Teflon, la surface de la cuve est subdivisée en deux compartiments: un compartiment A, dont la surface demeure intacte et un compartiment B situé entre le flotteur de mica et la barrière mobile (Fig. 3), où la monocouche est

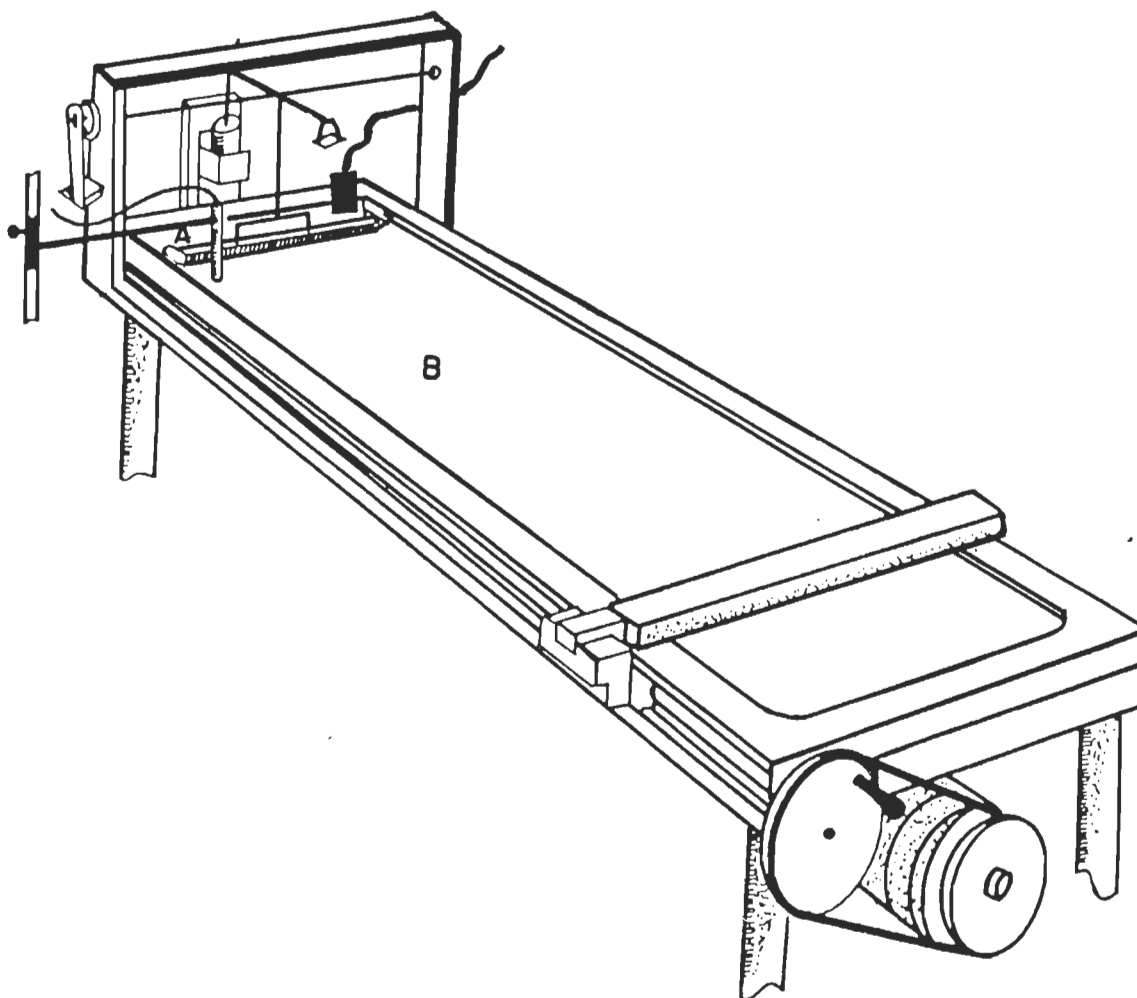


Fig. 3. Schéma de la cuve de Langmuir. Les détails sont donnés dans le texte.

préparée. L'ensemble du système: moteur entraînant la barrière mobile (lecture de l'aire moléculaire) d'une part, et l'ensemble de détection de la pression de surface d'autre part, est relié à un ordinateur qui permet d'enregistrer et de stocker les données. Le flotteur de mica est relié à un système de mesure constituant la balance de force de Langmuir, dont la calibration fréquente est indispensable pour établir sa sensibilité. Les

détails de la balance de force de Langmuir sont représentés à la figure 4. Le flotteur de 8 mm de largeur est traversé par une fourche métallique dont l'extrémité supérieure constitue une barre rigide en forme de T. Cette barre dont la partie horizontale est solidement fixée en son milieu à un fil de torsion, porte à l'une de ses extrémités un petit plateau, servant à l'étalonnage du balancier à l'aide de masses variant entre 50 et 2 000 mg dans le but de déterminer sa sensibilité. L'autre extrémité est attachée par un fil en Nylon, à un petit cylindre métallique à déplacements verticaux libres, à travers un solénoïde (Hewlett-Packard, modèle 7 DLDT, Kirkland, Montréal). Ce dernier transmet un signal électrique à un analyseur (Solid State Channelizer CML-1, Balley Instrument Inc., Montréal), puis à un enregistreur X-Y (Tracan Electronics Corp., modèle MFE 815M, Montréal). Ainsi, toute force exercée sur le flotteur provoque son déplacement horizontal à la surface de l'eau, déplacement mesuré par le biais du balancier et par le mouvement vertical du cylindre métallique à travers le solénoïde. Il en résulte un signal électrique exprimé en volts sur un multimètre, proportionnel à la force exercée sur le flotteur. Cette force qu'on appelle pression de surface, est exprimée par l'équation suivante:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3)$$

où Π , γ_0 et γ , exprimées en mN/m, sont respectivement la pression de surface, la tension superficielle de l'eau pure (section A de la cuve) et la tension superficielle de la section B. La sensibilité, S en mN/m.V, du balancier de Langmuir est déterminée par l'étalonnage quotidien du transducteur. Ceci nous permet de tracer la courbe de la masse (en gramme) appliquée sur le plateau du balancier de Langmuir (Fig. 4) en fonction du signal (en volts) développé par le transducteur linéaire. Cette courbe est une droite dont la pente est reliée à la sensibilité S . L'expression qui

représente cette proportionnalité est la suivante (Gaines, 1966):

$$S = \frac{p \times g \times L_h}{L_v \times L_f} \quad (4)$$

où p est la pente de la courbe de calibration, g la constante de gravité, L_h la longueur du bras horizontal de la tige en T (la portion qui porte le plateau de

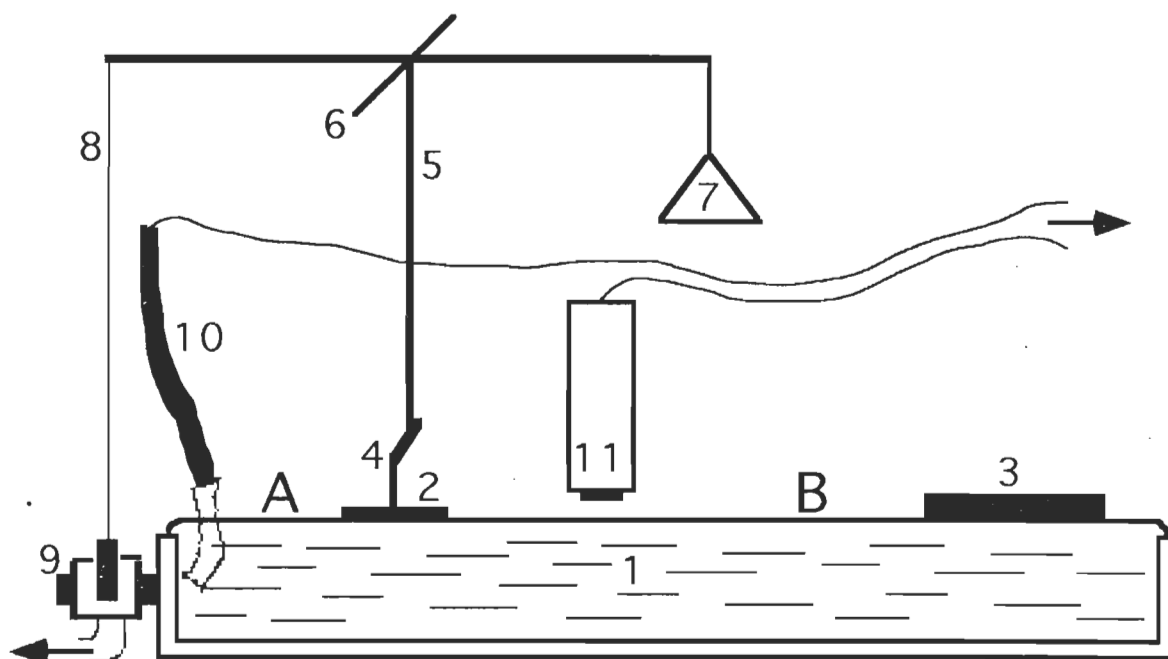


Fig. 4. Vue de profil de la balance de force de Langmuir. La cuve est remplie d'eau ou d'un tampon constituant la sous-phase (1) dont la surface est subdivisée par le flotteur (2) en deux compartiments: A et B. Compte tenu du flotteur, les autres éléments du balancier de Langmuir sont les suivants: la fourche métallique (4), la tige en T (5), le fil de torsion (6), le plateau de calibration (7), le fil en Nylon (8), et le transducteur linéaire (9). Le système de mesure du potentiel de surface consiste en une électrode en platine (10) et une électrode radioactive (11). Les flèches indiquent les voies de connexion à un multimètre.

calibration), L_v la hauteur de la tige en T (c'est-à-dire la distance du point où la tige est attachée au fil de torsion à la surface de l'eau), et L_f la longueur effective du flotteur. Celle-ci est égale à la moitié de la somme de

la longueur réelle du flotteur et de la largeur de la cuve (Fig. 4).

Les mesures obtenues grâce à la balance de Langmuir permettent de tracer une isotherme de la pression de surface (Π en mN/m) en fonction de l'aire moléculaire (A en Å²/molécule). L'isotherme traduit une propriété physique spécifique à chaque substance amphiphile, et offre des informations précieuses quant à l'orientation et à l'interaction des molécules dans une monocouche.

2. 3. 2. Mesure du potentiel de surface (ΔV)

Parallèlement aux mesures Π - A , on a aussi exploré les propriétés électriques de la monocouche grâce aux mesures du potentiel de surface (ΔV) en fonction de l'aire moléculaire.

L'interface air/eau est assimilée à un condensateur plan dont les plaques parallèles sont l'air et la phase sous-jacente (l'eau). À l'aide de deux électrodes, l'une dans l'eau et l'autre dans l'air (Fig. 4), une différence de tension peut être détectée à travers l'interface. Le potentiel de surface d'une monocouche, mesuré en millivolts, est défini comme étant la variation du potentiel à travers l'interface entre l'air et l'eau, après introduction de la monocouche. Il est représenté par l'expression suivante:

$$\Delta V = V_m - V_0 \quad (5)$$

où V_0 est la différence de tension mesurée en l'absence de la monocouche par rapport à une électrode de référence (Fig. 4), tandis que V_m est celle en présence de la monocouche. Pour mesurer cette quantité, les deux électrodes connectées à un multimètre sont placées de telle sorte qu'une électrode en platine servant de référence soit plongée dans le compartiment A, et que l'autre électrode radioactive, soit positionnée à une distance de 2

ou 3 mm de la surface de l'eau dans le compartiment B où la monocouche est étendue (Fig. 4). La source radioactive est de l'américium A^{241} ($20 \mu\text{Ci}$, Nuclear Radiation Development, NY) qui ionise l'air par émission α tout près de la surface de l'eau ce qui permet de créer une différence de tension entre les deux électrodes.

L'interprétation quantitative du potentiel de surface d'une monocouche est difficile quand il s'agit de l'attribuer à des molécules individuelles (Gaines, 1966). Toutefois, comme ce paramètre physique dépend de la densité des molécules, aussi bien que de leur orientation dans le film, le résultat est exprimé selon l'équation de Helmholtz (Schulman et Hughes, 1932; Olivera *et al.*, 1989), en fonction du moment dipolaire de la molécule:

$$\Delta V = 4 \pi n \mu_{\perp} \quad (6)$$

où n est le nombre de molécules adsorbées par unité de surface et μ_{\perp} , le moment dipolaire dans la direction perpendiculaire à l'interface. Si on considère l'aire occupée par molécule en \AA^2 et ΔV en millivolts, on exprime μ_{\perp} en millidebyes (mD) par l'équation suivante:

$$\mu_{\perp} = A \Delta V / 12 \pi \quad (7)$$

Grâce à μ_{\perp} , nous avons ainsi une indication sur l'orientation des molécules au sein de la monocouche.

2. 3. 3. Epandage des molécules amphiphiles à l'interface air/eau

Fraîchement préparé, le tampon qui constitue le substrat de la monocouche est versé dans la cuve de Langmuir. Afin d'être conditionnée à l'humidité à proximité de la surface, l'électrode radioactive est positionnée à environ 2 mm de la surface de l'eau pendant 30 à 45 minutes (Fig. 4). Ce

délai est nécessaire à la stabilité de la mesure du potentiel de surface. Il est également requis pour permettre aux impuretés tensio-actives de la sous-phase de s'adsorber à la surface avant le nettoyage. La température ambiante et l'humidité ambiante sont respectivement de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ et $60 \pm 10\%$. Les molécules fraîchement solubilisées dans un solvant approprié, sont puisées dans de petites fioles gardées fermées en permanence par une valve en Teflon (Pierce Co., Rockford, IL). Cette valve ne permet que la pénétration de l'aiguille de la seringue, et ce, afin d'éviter toute évaporation du solvant qui pourrait changer la concentration des molécules. L'épandage goutte à goutte, à divers points de la surface, se fait à l'aide d'une seringue de $100\ \mu\text{l}$, dont la pointe de l'aiguille est tenue à 4 ou 5 mm de la surface de l'eau. La concentration moléculaire interfaciale initiale du film est calculée de telle sorte que celui-ci soit à l'état gazeux. Afin de permettre l'évaporation totale du solvant, on attend 15 minutes avant de commencer la compression. Pendant toute la durée de l'expérience, la monocouche est soumise à une atmosphère d'azote afin d'éviter l'oxydation des molécules. Pour les monocouches mixtes, les mélanges aux fractions molaires désirées sont préparés juste avant l'épandage. Cependant, dans le cas des mélanges lipide-protéine où les solvants ne sont pas compatibles, les mélanges sont préparés à l'interface air/eau. On étale d'abord le lipide et, on attend que le benzène s'évapore complètement (15 mn), puisque nous avons noté que le benzène altère le cyt *c* si celui-ci est immédiatement déposé après le lipide. On étale ensuite la protéine à divers points de la surface dans un mélange éthanol:eau, 2:1 (v:v). La compression est amorcée 15 minutes plus tard. Puisque la concentration interfaciale initiale de la protéine ne doit pas dépasser $0.5\ \text{mg/m}^2$ (voir chapitre 1), à toutes les fractions molaires du mélange, le nombre de molécules déposées de chaque constituant est déterminé de telle

sorte que la surface totale du film mixte ne dépasse pas celle occupée par la protéine pure à la concentration interfaciale de 0.5 mg/m².

2. 3. 4. Autres techniques utilisées

Les autres techniques utilisées sont la spectrophotométrie UV-visible à l'interface air/eau et la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR). La spectrophotométrie à l'interface air/eau est réalisée grâce à un appareil conçu et mis au point dans notre équipe de recherche et dont les détails figurent dans le mémoire de maîtrise de Cherid (1992). D'autres spectres d'absorption UV-visible sont mesurés en solution sur les complexes Chl *a* -cyt *c* à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer 553.

Les spectres FTIR pris sur les films LB de complexes Chl *a* -cyt *c* ont fait l'objet d'une description par Es-Sounni *et al.* (1993). Dans ce cas une monocouche du mélange est transférée par la méthode LB sur une pastille de silicium à une pression de surface de 7.5 mN/m. Les spectres FTIR sont mesurés à l'aide d'un appareil Bomem DA3-02 (Vanier, Qué.) à transformée de Fourier. Cet appareil est muni d'un détecteur HgCdTe refroidi à l'azote liquide, et d'un séparateur de faisceau à KBr. Les spectres sont mesurés à partir de 500 à 1 000 balayages avec une résolution de 1 cm⁻¹, une apodisation triangulaire, et une correction de la ligne de base.

3. Interaction dans les systemes lipide-lipide et lipide-protéine

3. 1. Interaction lipide-lipide

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 2, le processus de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique implique deux photosystèmes au niveau de la membrane du thylacoïde, le PSI et le PSII. Chaque photosystème est un complexe pigment-protéine où s'effectuent la collecte et le transfert de l'énergie -grâce à une antenne- sous forme d'énergie d'excitation à un centre réactionnel où est amorcé le processus photochimique primaire de la photosynthèse par un transfert oxydo-réducteur d'électrons. Dans les deux cas, au niveau du transfert d'excitation d'énergie et à celui du transfert d'électrons, la Chl *a* est impliquée comme pigment essentiel. Dans le schéma en Z du transfert d'électrons, une réserve de plastoquinone joue un rôle important comme transporteur d'électron, servant ainsi à réduire le PSI et oxyder le PSII afin de déclencher le processus photosynthétique. Actuellement, il existe un nombre suffisant d'observations expérimentales qui montrent que la plastoquinone A, connue sous le nom de PQ9 (Grumbach,1983; Hooper,1984) remplit une part importante dans la fonction de transfert d'électrons à travers le thylacoïde (Amesz, 1973; Hauska, 1977; Arnon et Tang, 1986; McCauley et Melis, 1986), puisqu'elle représente 0.1 à 0.2 mole par mole de chlorophylle dans les tissus photosynthétiques (Grumbach, 1983; Hooper, 1984).

Dans la membrane du thylacoïde, la grande efficacité des transferts d'excitation et d'électrons est due à la nature de l'organisation intermoléculaire dans un système fluide orienté. Ce type d'environnement moléculaire n'est pas encore très bien connu, et on pourrait mieux le comprendre par l'étude de modèle reconstitué tel que celui de la

monocouche, un outil précieux qui permet de préciser l'organisation et l'orientation des amphiphiles au sein de la membrane (Ringsdorf *et al.*, 1988). Puisque la Chl *a in vivo* est liée, de façon non covalente à d'autres constituants lipoprotéiques, son interaction dans les mélanges binaires avec les lipides d'une part (Gaines, 1966; Guay et Leblanc, 1987), et avec les protéines d'autre part (Chin et Brody, 1976; Fidelio *et al.*, 1987; Lamarche *et al.*, 1988) a été étudiée. Cependant, on dispose de peu d'information sur l'interaction de la Chl *a* avec la PQ9 en monocouche mixte à l'interface air/eau. Antérieurement, les travaux de Guay et Leblanc (1987), basés sur l'évaluation de l'énergie libre en excès des mélanges, ont montré que la Chl *a* interagit avec les quinones de type α -tocophérylquinone et PQ3 et non avec la PQ9. Cependant, dans ce dernier cas, seules quelques fractions molaires ont été étudiées. Parmi les raisons qui ont minimisé l'importance des études de monocouche impliquant la PQ9, figurent son faible collapse ainsi que son instabilité à l'interface air/eau (De Costa *et al.*, 1972; Guay et Leblanc, 1987). Malgré cette contrainte et compte tenu de l'importance de la PQ9 dans la structure et la fonction de la membrane thylacoïdale, nous avons entrepris d'examiner les mélanges Chl *a* -PQ9 avec une gamme plus étendue de fractions molaires. Dans un premier temps, nous nous sommes familiarisés avec les techniques de purification et de monocouche en étudiant le système Chl *a* -PQ3. Il est à noter que ce système ayant déjà été bien caractérisé antérieurement (Guay, 1986) il ne fera pas l'objet principal de notre étude.

3. 1. 1. Etude thermodynamique du système binaire Chl *a* -PQ3 à l'interface air/eau

3. 1. 1. 1. Isothermes Π -A des constituants purs

Les courbes de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (A) de la Chl *a* et de la PQ3 sont représentées dans la figure 5. Chaque courbe est la moyenne de trois expériences dont l'écart entre les extrêmes est de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour la chlorophylle *a* et inférieur à $1 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour la PQ3. Dans ce dernier cas, quatre purifications ont été réalisées et l'écart maximum entre leur courbe moyenne est de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Seule la pression au collapse varie légèrement, comme c'est d'ailleurs le cas lors de la répétition d'une même expérience. Par pression au collapse Π_c , on entend la pression correspondant au changement de pente de l'isotherme à la fin de la portion linéaire observée dans la zone de hautes pressions. Pour la PQ3, la pression au collapse se situe à $8.00 \pm 0.25 \text{ mN/m}$. A titre comparatif, l'isotherme Π -A de la PQ3 obtenue par Guay (1986) est superposé à la nôtre dans la figure 5. Etant donné que l'écart maximal entre les deux isothermes n'est que de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, nous pouvons juger que les deux résultats sont similaires et bien reproductibles. Dans les deux cas, l'aire moléculaire limite est d'environ $62.5 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. De plus, la faible valeur de la pression au collapse (7-8 mN/m) montre que cette substance est facilement "collapsable". Nous reviendrons dans la section 3.1.2 pour caractériser l'isotherme Π -A de la Chl *a*, celle-ci étant la moyenne d'un plus grand nombre de courbes que celle présentée dans la figure 5.

3. 1. 1. 2 Isothermes Π -A des constituants en mélange

Les mélanges Chl *a* -PQ3 sont faits aux fractions molaires en Chl *a* de 0.2,

0.4, 0.6 et 0.8. Leur isotherme de pression de surface à l'interface air/eau est représentée dans la figure 5. Afin de tester la miscibilité de ces deux substances, différentes méthodes ont été utilisées.

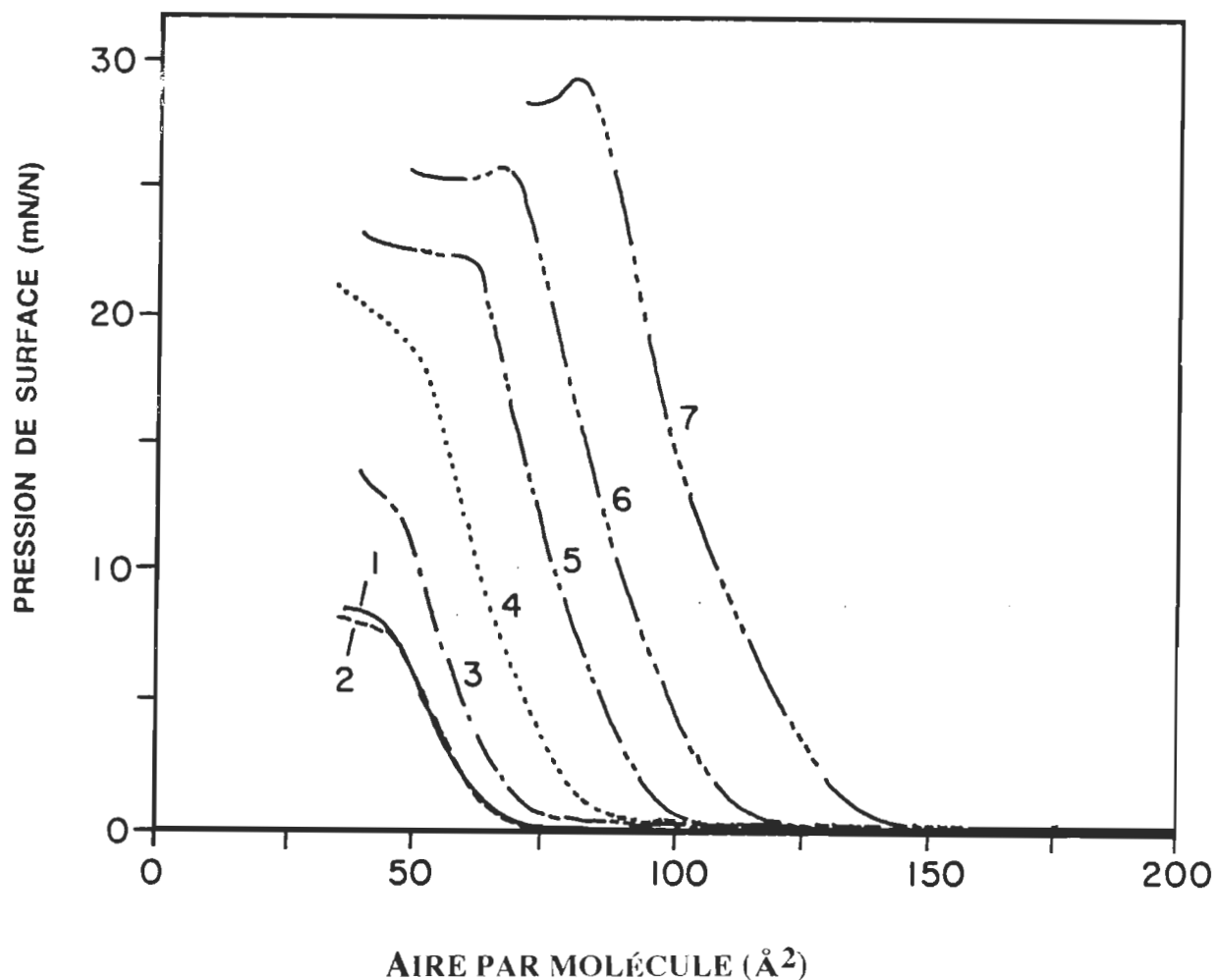


Fig. 5. Isothermes Π -A de la PQ3 (1), de la Chl *a* (7) et des mélanges Chl *a* -PQ3 aux fractions molaires suivantes de Chl *a*: 0.2 (3), 0.4 (4), 0.6 (5), et 0.8 (6). La courbe 2 représente celle de la PQ3 obtenue par Guay (1986). Sous-phase: tampon phosphate, 1 mM, pH: 8.

3. 1. 1. 2. 1. Test de miscibilité par la règle d'additivité

La règle d'additivité est exprimée par l'équation 1 (voir chapitre 1). Tous les points expérimentaux déduits des mélanges Chl *a* -PQ3 sont

décalés négativement par rapport à leur courbe idéale prédite par la règle d'additivité (Fig. 6). Cette déviation négative observée pour toutes les fractions molaires en Chl *a*, et à toutes les pressions de surface inférieures aux deux collapses, est maximale à environ 0.4 mole de Chl *a*. Cette donnée expérimentale prouve la miscibilité des deux constituants et l'existence d'une interaction intermoléculaire entre les deux constituants de la monocouche (Gaines, 1966). De plus, ces résultats sont en accord avec ceux de Guay (1986).

3. 1. 1. 2. 2. Test de miscibilité par la règle des phases à deux dimensions

Cette règle, développée par Crisp (1949), prévoit la variation de la pression de surface au collapse en fonction de la composition pour une monocouche mixte dont les constituants sont miscibles. Par contre, si les constituants du film ne sont pas miscibles, la pression de surface au collapse ne varie pas en fonction de la composition. L'examen de la figure 5 montre bien la variation continue de la pression au collapse (Π_c) pour toutes les fractions molaires étudiées et, qu'une fois de plus, la miscibilité de la Chl *a* et la PQ3 est évidente.

3. 1. 1. 2. 3. Test de miscibilité par évaluation de l'énergie libre en excès du mélange

Afin de mieux comprendre la thermodynamique de l'interaction entre les molécules de la chlorophylle *a* et celle de la PQ3, on évalue l'excès d'énergie libre molaire du mélange, $\Delta G_m^{E,\Pi}$ (équation 2, chap. 1) aux différentes fractions molaires étudiées et à la pression de surface Π . Les résultats obtenus à partir des isothermes Π -A de la figure 5 sont représentés dans la figure 7. Afin de faciliter la comparaison avec les résultats de Guay

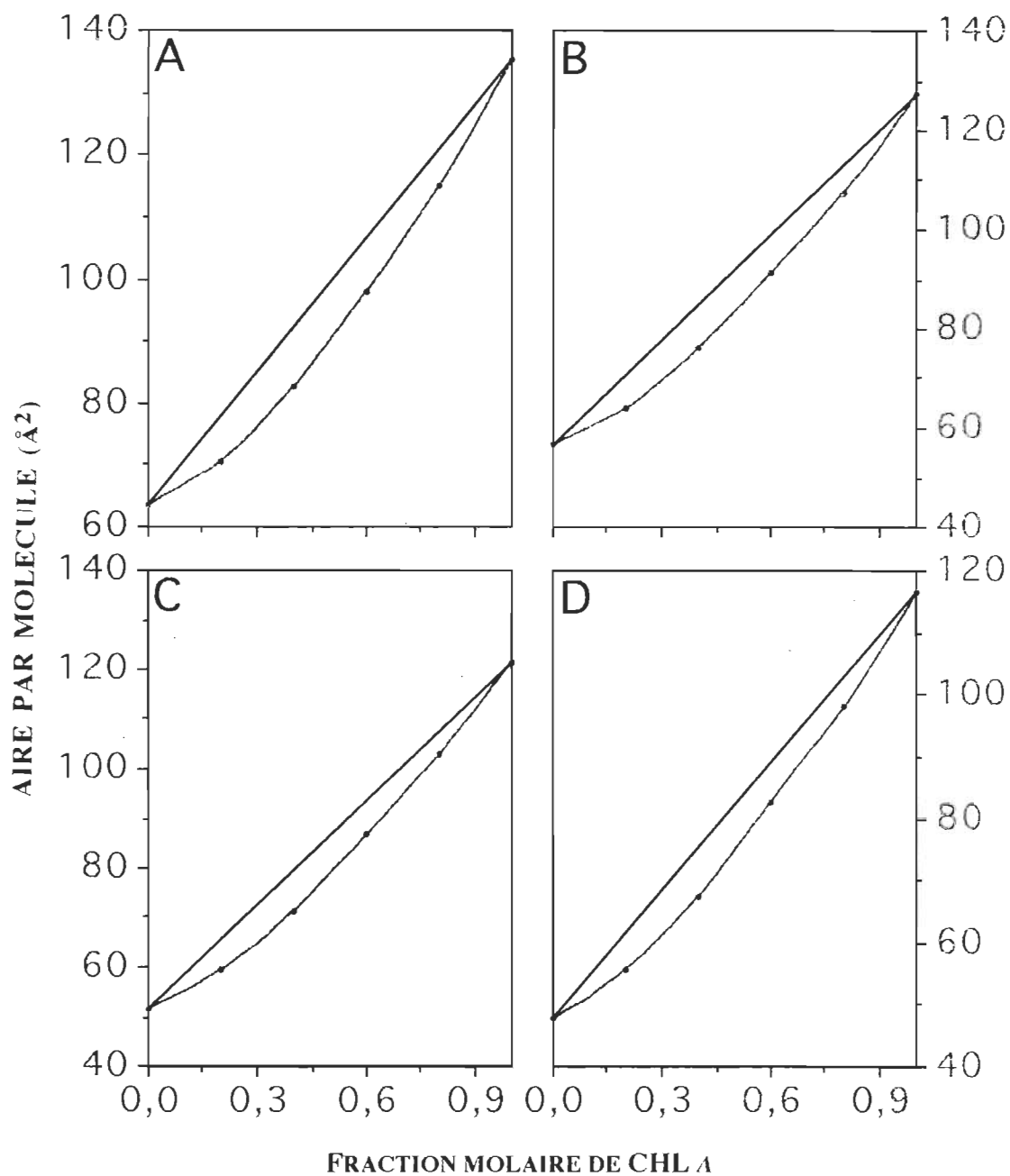


Fig. 6. L'aire moléculaire du mélange Chl *a*-PQ 3 en fonction de la fraction molaire de Chl *a* aux pressions de surface de: 1 mN/m (A), 3 mN/m (B), 5 mN/m (C) et 7 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales.

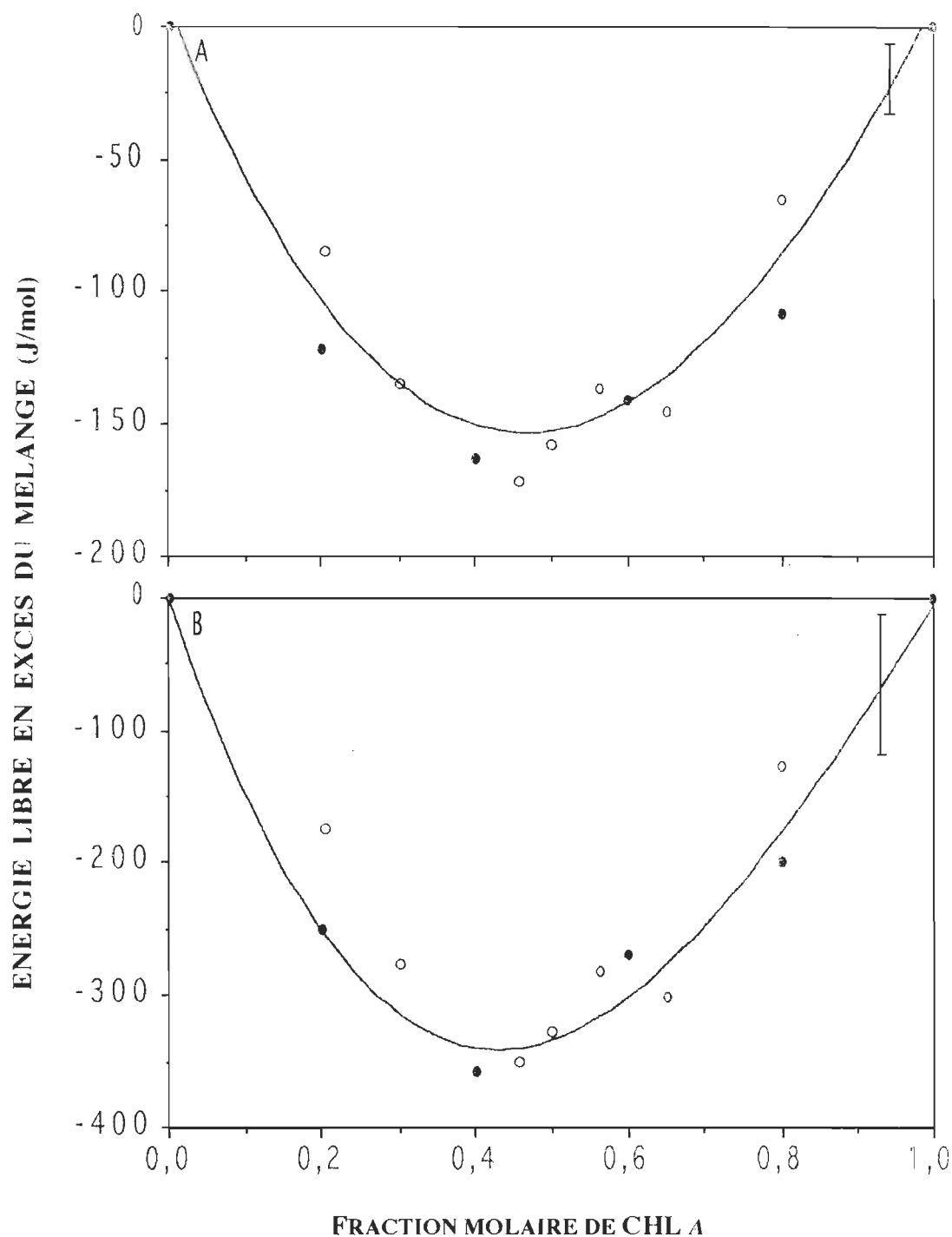


Fig. 7. Énergie libre de mélange en excès pour le système Chl *a*-PQ3 en fonction de la fraction molaire de Chl *a*, aux pressions de surface de: 3 mN/m (A) et 7 mN/m (B). Les cercles pleins représentent nos valeurs, comparées à celles de Guay (1986) représentées par les cercles vides. La barre verticale indique l'erreur enregistrée sur les mesures.

(1986). nous avons présenté ces résultats avec les nôtres sur la même figure. On note des valeurs négatives de $\Delta G_m^{E,\Pi}$ et minimum à environ 0.4 mole de Chl *a* qui se comparent très bien, dans les limites permises par l'erreur expérimentale, à ceux de Guay (1986). Les données expérimentales montrent l'existence d'une interaction entre les constituants (Gaines, 1966), bien que faible (quelques centaines de joules par mole seulement), dans un complexe stable Chl *a* -PQ3. La nature d'une telle interaction est difficile à déterminer à partir d'une observation thermodynamique unique des isothermes Π -A. Elle pourrait impliquer la partie polaire des molécules de la plastoquinone et les groupements polaires de la Chl *a* telle que suggérée par Tancrède *et al.* (1982) pour les mélanges Chl *a* -MGDG et Chl *a* -phytol. Cette suggestion est basée sur le fait que le phytol, une molécule essentiellement hydrophobe grâce à sa longue chaîne hydrocarbonée saturée, forme un mélange idéal avec la Chl *a* (Tancrède *et al.*, 1982).

3. 1. 2. Etude thermodynamique du système binaire Chl *a*-PQ9 à l'interface air/eau

3. 1. 2. 1. Isothermes Π -A et ΔV -A des constituants purs

En solution dans l'éthanol, la PQ9 donne un spectre d'absorption dans l'U.V. caractéristique de la forme oxydée avec une absorbance maximum à 254 nm. Cette observation est en accord avec celle d'autres chercheurs montrant qu'en plus, la PQ9 sous sa forme réduite, perd cette bande principale à 254-256 nm, celle-ci étant remplacée par une bande de plus faible intensité absorbant à une longueur d'onde approximative de 290 nm (Amesz, 1973; Lichtenthaler, 1977).

Le critère de pureté utilisé pour la PQ9 est le test par chromatographie

sur couche mince (CCM). Contrairement à ce qui a été obtenu avec la PQ3 très contaminée, la PQ9 ne montre qu'une seule tache ($R_f \approx 0.9$) accompagnée d'une légère traînée. Après purification (cf. chapitre 2), une seule tache subsiste dont le R_f moyen (à partir de 6 purifications) est de 0.87, valeur comparable à celle de 0.9 rapportée par Guay et Leblanc (1987). La PQ9 purifiée (Fig. 8), résulte de 23 courbes obtenues à partir de 7 purifications différentes. Pour toutes ces purifications, la déviation maximale entre les courbes moyennes extrêmes est de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Par ailleurs, la PQ9 a une aire moléculaire de $5 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ plus grande que celle de la PQ9 non purifiée (résultat inédit), et ce, à toutes les pressions de surface. Cette différence peut être attribuée à l'existence d'impuretés, probablement des produits de dégradation comme ceux révélés par la CCM. En outre, comparés aux résultats de Guay (1986), notre isotherme Π -A de la PQ9 pure est décalée de $4 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ vers les grandes aires moléculaires. Cette différence peut être due aux différentes conditions expérimentales utilisées, spécialement dans notre cas où les mesures prises à l'aide d'un système automatique équipé d'un ordinateur sont vraisemblablement plus précises. L'isotherme Π -A de la PQ9 pure montre que ce constituant collapse à une très faible pression de surface ($\Pi_c = 1.4 \text{ mN/m}$). L'aire moléculaire correspondante est de $68 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ ce qui est en très bon accord avec la valeur d'environ $65 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ calculée grâce au modèle atomique CPK (section efficace de la projection de la structure moléculaire). Cette corrélation suggère que dans la monocouche, la PQ9 est orientée de telle sorte que sa tête polaire soit parallèle à la surface de l'eau. Afin de vérifier la stabilité de la monocouche de la PQ9, nous l'avons soumise à une série de cycles compression-expansion. Après la première compression à une pression de surface inférieure ou même supérieure au collapse, les isothermes de recompression

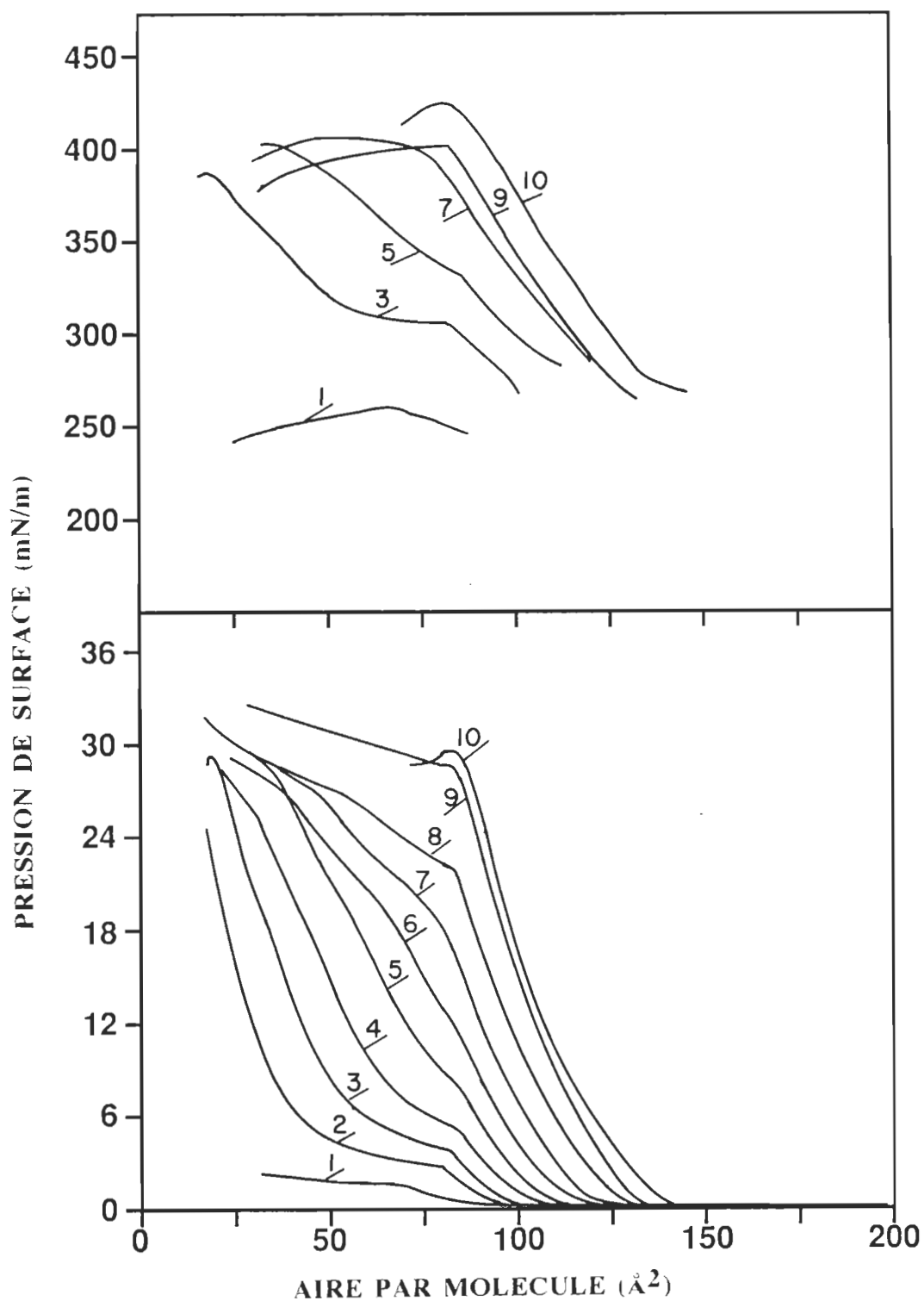


Fig. 8. Isothermes Π -A (partie inférieure) et ΔV -A (partie supérieure) de la PQ9 (1), de la Chl *a* (10) et de leurs mélanges (2-9), aux fractions molaires de Chl *a* : 0.2, 0.3, ..., et 0.9. Pour la clarté de la figure, certaines courbes de potentiel de surface ne sont pas représentées. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8, température: 20 ± 1 °C.

n'ont révélé aucun hystérèse et, étaient par conséquent tout à fait semblables à la recompression finale. Nos résultats montrent donc bien, que la PQ9 a un plateau très bas. Elle donne une monocouche très stable contrairement à ce qui est rapporté par d'autres chercheurs (De Costa *et al.*, 1972).

Les mesures du potentiel de surface de la PQ9 ne figurent pas dans les travaux antérieurs. L'isotherme ΔV -A de la PQ9 pure présentée dans la figure 8, montre que la monocouche de PQ9 est caractérisée par un potentiel de surface très faible, avec des valeurs reproductibles uniquement entre 246 mV et 257 ± 5 mV, correspondant respectivement à une pression de surface de 0.5 mN/m et à celle du collapse, 1.4 mN/m. Aux pressions de surface inférieures à 0.5 mN/m, l'isotherme ΔV -A montre de très grandes fluctuations similaires à celles généralement observées dans les monocouches lipidiques à l'état gazeux. Ces fluctuations peuvent être causées par des îlots flottants du constituant.

L'isotherme Π -A de la Chl *a* pure (figure 8) représente une moyenne de 34 courbes obtenues à partir de 5 extractions. La déviation maximale entre les courbes provenant de la même solution, est de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ et l'écart maximal observé entre les courbes moyennes extrêmes, est de $6 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour toute la gamme de pression de surface. L'évaluation de l'aire moléculaire ($101 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ à 15 mN/m) montre que l'isotherme Π -A de la Chl *a* utilisée dans cette étude, est similaire à celle rapportée antérieurement par d'autres chercheurs, soit $103 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (Guay, 1986), $104 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (Chapados *et al.*, 1980) et $100 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (Tancrède *et al.*, 1982). La pression au collapse et l'aire moléculaire correspondante sont respectivement de 28.5 mN/m et $82 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Tenant compte de l'erreur expérimentale enregistrée pour les différentes extractions, la valeur de la pression au collapse est en bon accord avec celle rapportée

antérieurement par Tancrède *et al.* (1982) soit approximativement 29 mN/m. L'isotherme ΔV -A de la Chl *a* présentée dans la figure 8 montre une augmentation régulière de 260 mV à 420 mV \pm 5 mV. L'erreur expérimentale déterminée pour toutes les extractions est de l'ordre de \pm 20 mV. Parallèlement à la pression au collapse, un plateau est également observé au niveau de l'isotherme ΔV -A, celui-ci correspond à la saturation du potentiel de surface de la monocouche résultant de la formation d'une phase macroscopique.

3. 1. 2. 2. Isothermes Π -A et ΔV -A des constituants en mélanges

Les isothermes Π -A des mélanges Chl *a*-PQ9 à différentes fractions molaires de Chl *a* sont illustrées dans la figure 8. L'erreur expérimentale enregistrée pour ces mélanges est d'environ $\pm 1 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Appliquant la règle d'additivité (équation 1), les données déduites graphiquement de la figure 8 et représentées dans la figure 9 montrent que la PQ9 et la Chl *a* forment des mélanges idéaux, sans toutefois révéler de signe d'interaction, et ce, quelle que soit la pression de surface ou la fraction molaire en Chl *a*. Cependant, en appliquant la règle des phases en deux dimensions (Crisp, 1949), nous avons remarqué que, pour les mélanges dont la fraction molaire de Chl *a* est comprise entre 0.3 et 0.8 (Fig. 8 et 10), deux pressions au collapse sont observées: Π_{c1} qui varie avec la composition de la monocouche et Π_{c2} dont la valeur demeure constante à environ 27 mN/m. Ces deux collapses sont habituellement attribués à la désorption respective des deux constituants de la monocouche (Gaines, 1966). En fait, l'existence de deux collapses indique une séparation de phases et donc une immiscibilité entre les deux composantes. Par contre, si un seul collapse était présent, celui-ci caractériserait un mélange idéal (Crisp, 1949; Gaines, 1966; Gabrielli *et al.*, 1981; Fidelio *et al.*, 1987). La règle des phases prédit

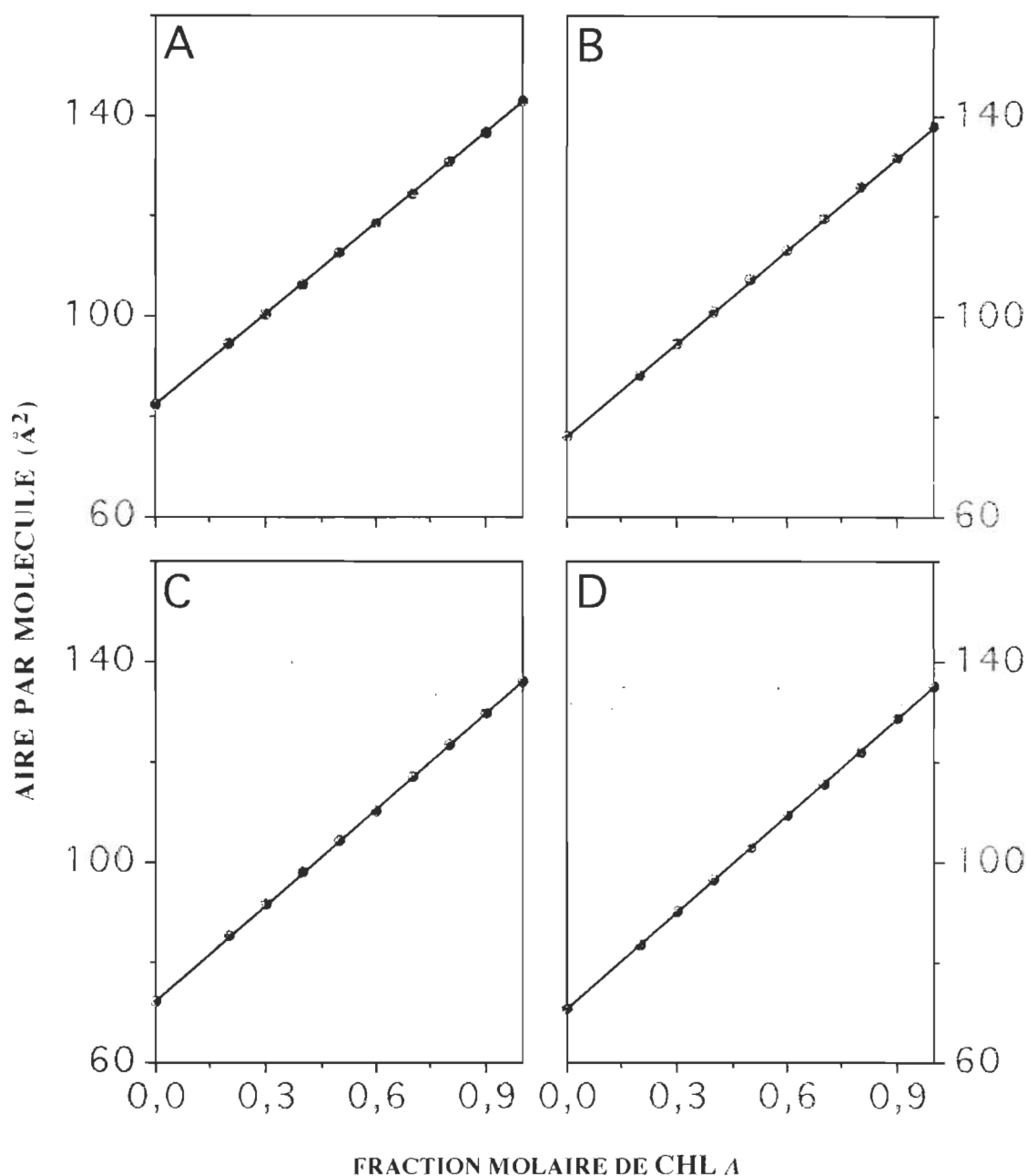


Fig. 9. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la Chl a pour le système Chl a-PQ 9. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 8 aux pressions de surface de: 0.4 mN/m (A), 0.7 mN/m (B), 1 mN/m (C) et 1.2 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales.

également qu'un mélange immiscible est caractérisé par une pression au

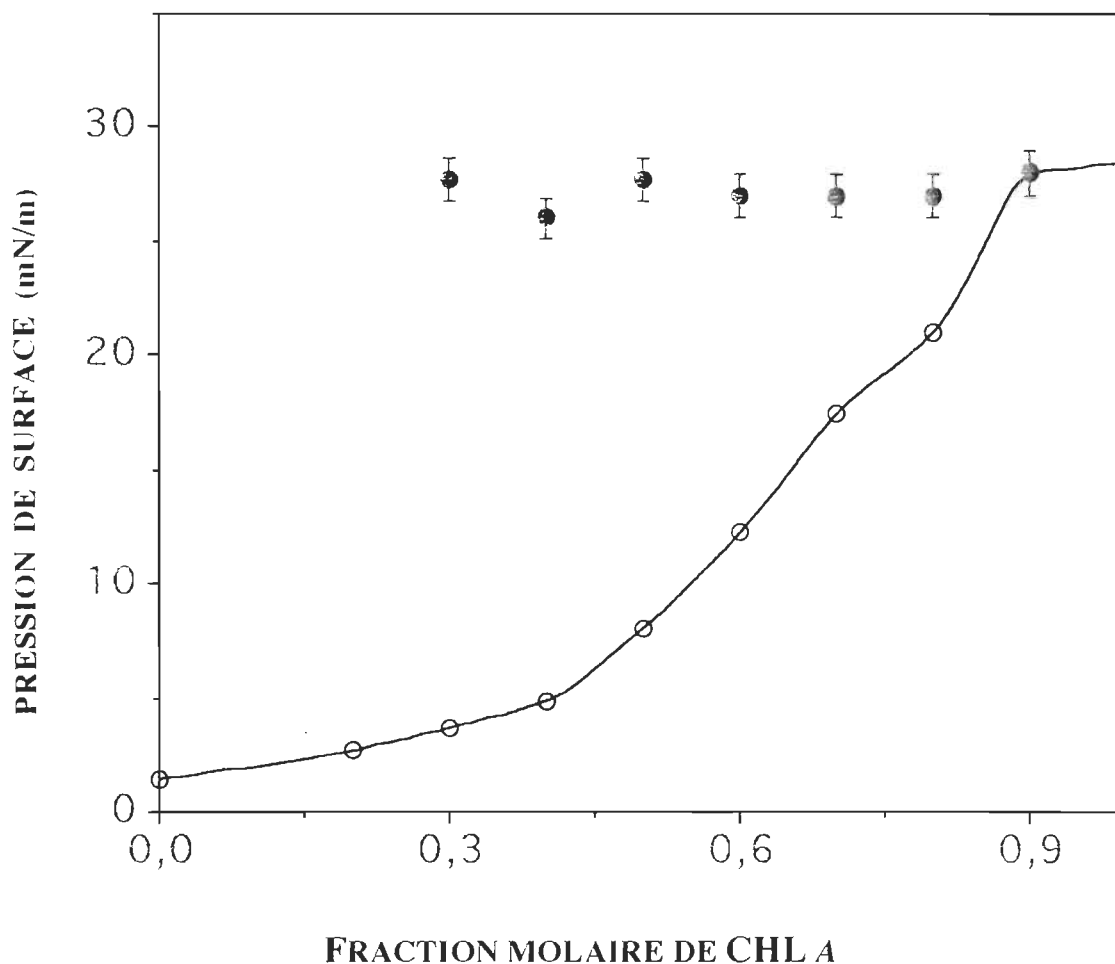


Fig. 10. Variation des deux collapses Π_{c1} (cercles blancs) et Π_{c2} (cercles noirs) en fonction de la fraction molaire de la Chl a .

collapse constante, habituellement au collapse le plus bas des deux constituants; en revanche, dans un système miscible, la pression au collapse dépend de la composition de la monocouche (Crisp, 1949; Gaines, 1966). En se basant sur cette règle, nous suggérons que la variation de Π_{c1} avec la composition du film tel qu'observé dans les figures 8 et 10, pourrait indiquer une miscibilité partielle entre la Chl a et la PQ9 aux pressions de surface inférieures à Π_{c1} . Aux pressions supérieures, les molécules de PQ9 pourraient être éjectées de la monocouche pour entrer en interaction

hydrophobe avec la chaîne latérale de la Chl *a* (Guay et Leblanc, 1987). Une interprétation similaire a été donnée dans d'autres cas de mélanges binaires à l'interface azote/eau (Tancrède *et al.*, 1982). Lorsque la fraction molaire de Chl *a* atteint 0.9, l'isotherme du mélange montre un seul collapse situé à 28 mN/m, ce qui pourrait indiquer une miscibilité complète entre les deux constituants à toutes les pressions de surface. L'éjection des molécules de PQ9 de la monocouche du mélange aux pressions supérieures à Π_{c1} peut être une fois de plus démontrée en traçant les mêmes isothermes Π -A de la figure 8, où cette fois-ci l'aire moléculaire est calculée en ne tenant compte que du nombre de molécules de Chl *a*. Les résultats présentés dans la figure 11 montrent que pour tous les mélanges dont la fraction molaire est comprise entre 0.2 and 0.8 et aux pressions de surface supérieures à Π_{c1} , la contribution de l'aire moléculaire des molécules de PQ9 est graduellement réduite jusqu'à 0 Å²/molécule à environ 22 mN/m (où l'aire moléculaire est celle de la Chl *a* pure). Un résultat similaire a été observé antérieurement dans le cas du système DOPC-cyt *c*, où la contribution de l'aire moléculaire due aux molécules de la protéine était attribuée à leur incorporation à partir de la sous-phase (Lamarche *et al.*, 1988). La figure 11 montre aussi qu'à la fraction molaire en Chl *a* de 0.9 pour laquelle nous suggérons une miscibilité totale dans les monocouches de mélanges, les molécules de plastoquinone demeurent dans le film mixte jusqu'à la pression au collapse. Les isothermes ΔV -A enregistrées avec une erreur de ± 10 mV pour les monocouches mixtes Chl *a* -PQ9 sont représentées dans la figure 8 (partie supérieure). Une caractéristique remarquable de ce diagramme est l'existence d'un point de courbure vis-à-vis de la même aire moléculaire correspondant au collapse Π_{c1} . Bien que nous soyons en présence d'une observation qualitative, ce résultat est un argument supplémentaire en faveur de l'éjection des molécules de PQ9 de

la monocouche mixte aux pressions supérieures à Π_{c1} . Le second collapse observé dans le diagramme ΔV -A correspondant à Π_{c2} , a un potentiel de

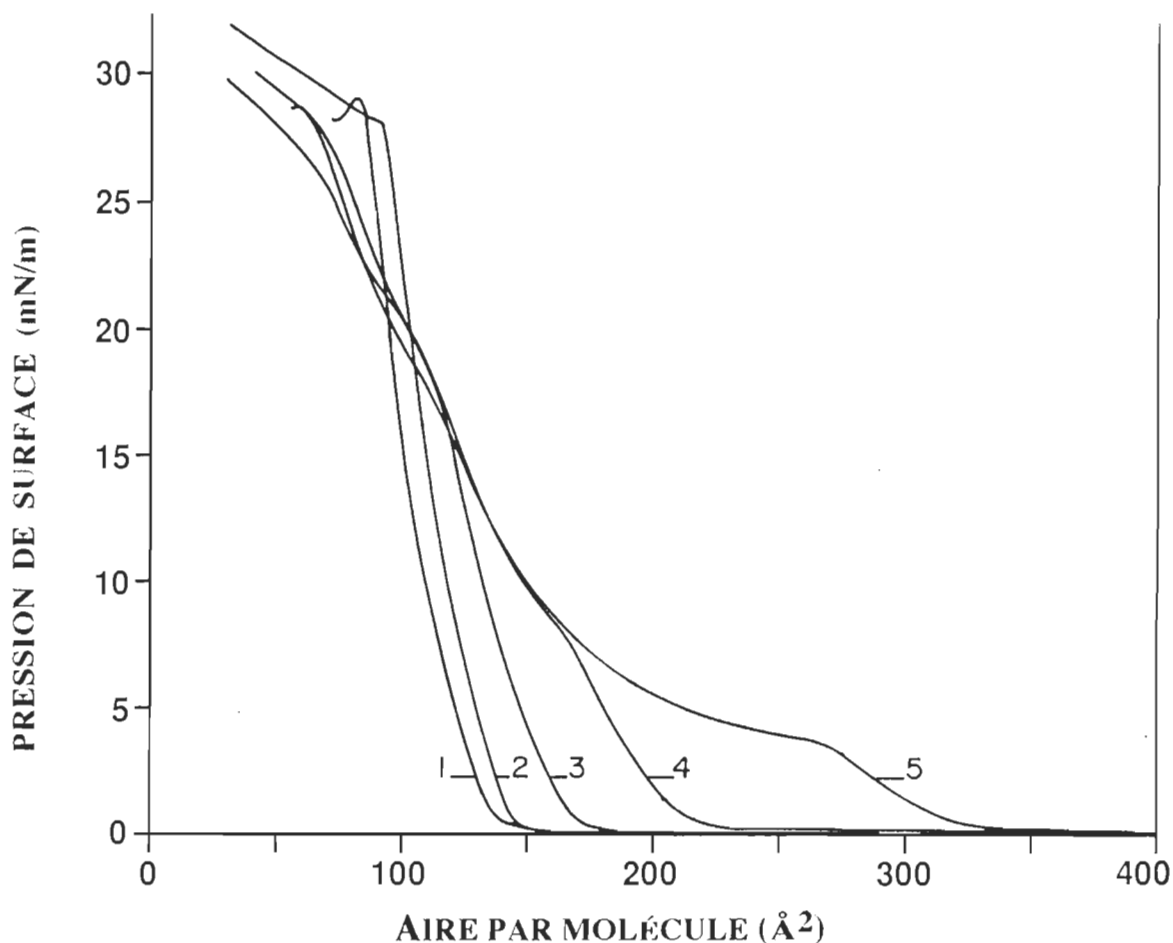


Fig. 11. Isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire de la Chl *a* et des mélanges Chl *a* -PQ9 obtenues à partir de la figure 8, où l'aire moléculaire est déterminée en ne tenant compte que du nombre de molécules de Chl *a*. La fraction molaire réelle de la Chl *a* est: 1 (1), 0.9 (2), 0.7 (3), 0.5 (4) et 0.3 (5). Noter qu'à l'exception de la courbe 2 où les molécules de la PQ9 demeurent dans la monocouche jusqu'au collapse de la Chl *a*, une diminution rapide de l'aire moléculaire affecte toutes les autres courbes lorsque la pression de surface est supérieure au plateau (Π_{c1}). Pour la clarté de la figure, les autres fractions molaires ne sont pas représentées.

surface moyen d'environ 395 ± 10 mV pour tous les mélanges, une valeur qui correspond à celle de la Chl *a* pure dans les limites de l'erreur expérimentale. La règle d'additivité appliquée au potentiel de surface est

exprimée par l'équation suivante (Gaines, 1966):

$$\Delta V_m^\Pi = x_1 V_1^\Pi + x_2 V_2^\Pi \quad (8)$$

À pression de surface constante, ΔV_m est le potentiel de surface du mélange, tandis que V_1 et V_2 sont les potentiels de surface des constituants purs aux fractions molaires x_1 et x_2 . Afin d'apporter la correction liée à la densité moléculaire de surface, il est souhaitable d'exprimer le potentiel de surface par molécule (Shah et Schulman, 1967; Möhwald, 1990) en utilisant l'expression $\Delta V/n$, où n représente le nombre de molécules par cm^2 . Puisque l'aire moléculaire est la réciproque de n , l'équation 8 devient:

$$A_m^\Pi \Delta V_m^\Pi = x_1 A_1^\Pi V_1^\Pi + x_2 A_2^\Pi V_2^\Pi \quad (9)$$

où $A\Delta V$ est le potentiel de surface moyen par molécule. Comme on peut voir dans la figure 12, les résultats expérimentaux pour la plupart des fractions molaires de Chl *a* (0.3 à 0.7) n'obéissent pas -mais se décalent plutôt positivement par rapport- à la règle d'additivité. Cette déviation pourrait indiquer une possibilité d'interaction entre les deux molécules, probablement due à une réorientation des groupements polaires des deux constituants.

À la lumière de la discussion ci-dessus, on peut conclure que la PQ9 forme une monocouche stable à l'interface air/eau. Par ailleurs, en mélange avec la Chl *a*, celle-ci donne des monocouches miscibles, elle peut soutenir des pressions latérales relativement élevées et comparables à celles rapportées pour les membranes biologiques, soit 20 à 30 mN/m (Fidelio *et al.*, 1986; Birdi, 1989) et ce, seulement si la fraction molaire en PQ9 est faible (0.1). Cette faible fraction molaire en PQ9 est comparable à celle généralement rapportée pour les tissus photosynthétiques (0.1-0.2 mol/mol

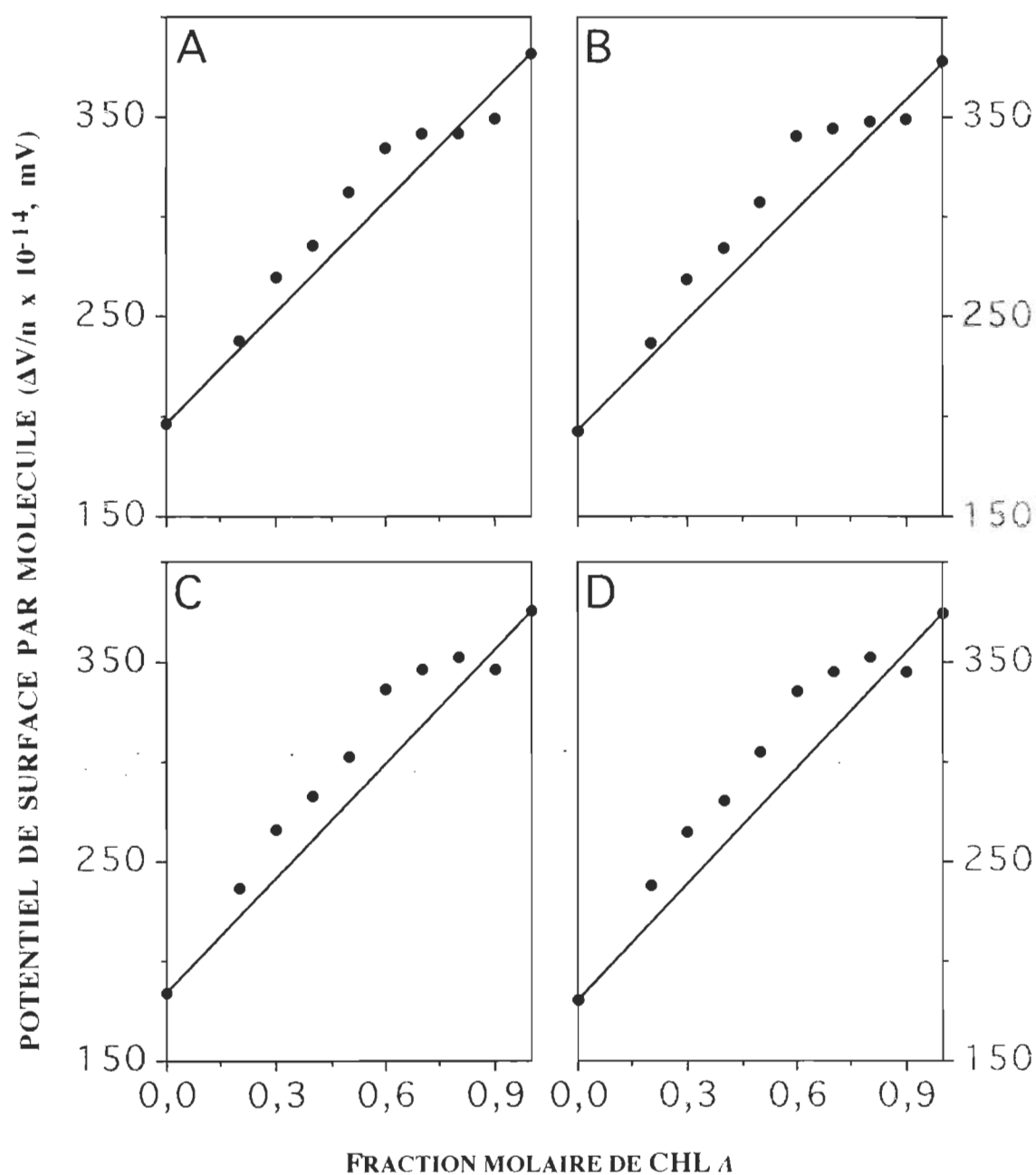


Fig. 12. Le potentiel de surface exprimé par molécule ($\Delta V/n$), est représenté en fonction de la fraction molaire en Chl a pour le système Chl a-PQ9. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 8 aux pressions de surface de: 0.4 mN/m (A), 0.7 mN/m (B), 1 mN/m (C) et 1.2 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 9)- et les valeurs expérimentales.

de chlorophylle) (Grumbach, 1983; Hooper, 1984). Ainsi, sur la base de nos résultats, il est proposé que la Chl *a* et la PQ9 sont capables d'interactions dans la bicouche thylacoïdale. Par contre, ces résultats ne sont pas en accord avec ceux d'autres chercheurs montrant que la PQ9 est prise en "sandwich" dans le coeur hydrophobe de la bicouche (Robert et Tancrède, 1991). Soulignons enfin que ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Langmuir* (Es-Sounni et Leblanc, 1992).

3. 2. Interaction lipide-protéine

3. 2. 1. Étude des monocouches des cyt *c* et *f* à l'interface air/eau

Les cyt *c* et *f* appartiennent au groupe des protéines globulaires hydrosolubles dont la fonction est très bien établie dans la chaîne de transfert d'électrons, le premier dans la chaîne respiratoire mitochondriale et le second dans la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique au niveau du thylacoïde (Hurt et Hauska, 1981; Stryer, 1988; Willms *et al.*, 1987). Contrairement au cyt *c* dont la cristallisation a permis de connaître sa structure tridimensionnelle, celle du cyt *f* demeure encore l'objet de spéculations, et ce, à cause de l'absence de sa forme cristalline. Constitué de 104 acides aminés, la molécule du cyt *c* est grossièrement une sphère d'un diamètre de 34 Å, liée à la périphérie de la membrane par des interactions de type électrostatique (Stryer, 1988). Quant au cyt *f*, il existe plusieurs travaux sur l'extraction, la purification et l'établissement de sa séquence d'acides aminés (Gray, 1978; Ho et Krogmann, 1980; Willey *et al.*, 1984), cependant, un seul modèle de sa fonction dans la membrane du thylacoïde a été proposé. Celui-ci prévoit que la molécule constituée de 285 acides aminés est subdivisée en trois domaines dont un premier transmembranaire très hydrophobe (voir chapitre 1). C'est à cause de cette

propriété que le *cyt f* forme des agrégats de type octamère lorsqu'il entre en contact avec une phase aqueuse (Willey *et al.*, 1984). Par contre, dépourvu du domaine transmembranaire et du C-terminal, la majeure partie du *cyt f*, c'est-à-dire la partie globulaire exposée à l'espace intrathylacoïdal (résidus 1-250, le N-terminal et le groupement hème), garde ses propriétés monomères en solutions aqueuses. De plus, c'est cette partie qui interagit avec la plastocyanine dans la chaîne de transfert d'électrons (Willey *et al.*, 1984). Donc, sous sa forme monomère qui lui attribue des propriétés physico-chimiques comparables à celles du *cyt c*, nous pouvons aborder l'étude des propriétés interfaciales du *cyt f*, aussi bien à l'état pur qu'en mélange avec les lipides.

Bien que la plupart des protéines soient hydrosolubles, elles peuvent être répandues à l'interface air/eau et former une monocouche très stable. Bien que la majorité des travaux classiques aient été publiés sur l'adsorption des protéines à l'interface air/eau à partir d'une solution aqueuse (Phillips, 1977; Graham et Phillips, 1979 a-c; Hunter *et al.*, 1990), on note plusieurs investigations sur l'épandage de ces molécules à la surface de l'eau qui ont montré qu'une protéine bien étalée, occupe une aire moléculaire de $1 \text{ m}^2/\text{mg}$ (MacRitchie, 1986). Une telle situation qui correspond à une structure moléculaire dépliée et organisée en segments (de 6 à 10 amino-acides), définis comme queues et boucles, dirigés vers l'air ou la sous-phase en fonction de leur polarité, est connue sous le terme de dénaturation de surface qui affecte les protéines (MacRitchie, 1986). Malgré cet état dénaturé, l'étude de l'interaction de telles protéines avec les lipides offre l'avantage de comprendre les interactions lipide-protéine dans les membranes biologiques puisque, seuls les segments hydrophobes sont insérés dans le coeur membranaire.

3. 2. 1. 1. Paramètres qui influencent la stabilité des monocouches des cyt *c* et *f*

L'étude du cyt *c* à l'interface air/eau a montré que, indépendamment de la méthode utilisée (par adsorption à partir de la sous-phase, par épandage à partir de cristaux ou d'une solution), on obtient des isothermes de pression de surface et de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire de forme identique (Lamarche, 1988). Cela voudrait dire que la conformation du cyt *c* à l'interface air/eau est la même, que la protéine soit adsorbée ou répandue à la surface. Ce phénomène est d'ailleurs démontré pour d'autres protéines dont les propriétés interfaciales demeurent inchangées, que leur monocouche soit formée à partir de la surface ou de la sous-phase (Pilon *et al.*, 1987; Krebs *et al.*, 1988). Certains paramètres comme la concentration interfaciale initiale, la méthode ou le solvant d'épandage peuvent affecter la stabilité des monocouches à base de protéine. L'influence de ces paramètres se traduit par des modifications quantitatives parfois très marquées sur les isothermes, particulièrement au niveau de l'aire moléculaire et de la position du collapse.

3. 2. 1. 1. 1. Influence de la méthode et du solvant d'épandage

Comme la plupart des protéines globulaires sont hydrosolubles, leur épandage en monocouche à partir d'une solution purement aqueuse ne peut se faire sans perte d'une partie de leur matériel dans la sous-phase. La technique généralement utilisée à cette fin et qui a donné les meilleurs résultats fut développée par Trurnit (Trurnit, 1960). Nous avons tenté d'appliquer ladite technique qui consiste à écouler lentement (environ 2 ml/mn) la solution aqueuse de protéine sur la surface du tampon par l'intermédiaire d'une tige de verre de 5 mm de diamètre, dressée

perpendiculairement à environ 3 cm à l'extérieur de la surface de la cuve. Malheureusement, les expériences réalisées avec le *cyt f* ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants, puisque non seulement les isothermes Π -A ne sont pas reproductibles dans les limites permises par l'erreur expérimentale, mais qu'en plus, l'aire moléculaire obtenue pour chaque isotherme apparaissait beaucoup plus faible que celle prévue, phénomène qui montre clairement une solubilisation d'une partie importante du matériel dans la sous-phase (Fig. 13). En outre, la compression de telles monocouches ne nous a pas permis d'atteindre le collapse, mais plutôt un niveau où l'augmentation de la pression et du potentiel de surface est arrêtée, et ce, même comprimées jusqu'à 1 cm du flotteur. Il en est de même, lorsque la protéine est déposée à partir d'une solution purement aqueuse ou d'une solution aqueuse contenant 60 % d'isopropanol et 0.5 M d'acétate de sodium tel que conseillé pour les protéines (MacRitchie, 1986). Ce dernier solvant s'est d'ailleurs avéré incompatible avec les deux *cyt* puisque sitôt préparée, la solution protéique paraissait légèrement opaque à cause de la présence d'agrégats dont on a noté la précipitation en fonction du temps. Afin de surmonter ce problème, nous avons utilisé un mélange éthanol/eau. Pour le *cyt c*, le mélange éthanol:eau (2:1, v:v) a donné de bons résultats quant à la stabilité de la protéine à l'interface air/eau (Lamarche, 1988). Par contre, pour le *cyt f*, des résultats reproductibles sont obtenus avec un mélange éthanol:eau (1:1, v:v).

3. 2. 1. 1. 2. Influence de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes

Par concentration interfaciale initiale, nous entendons le nombre de molécules initialement déposé sur l'aire maximale de la cuve, soit environ 0.06 m^2 dans notre cas. La solubilisation de la protéine dans la sous-phase

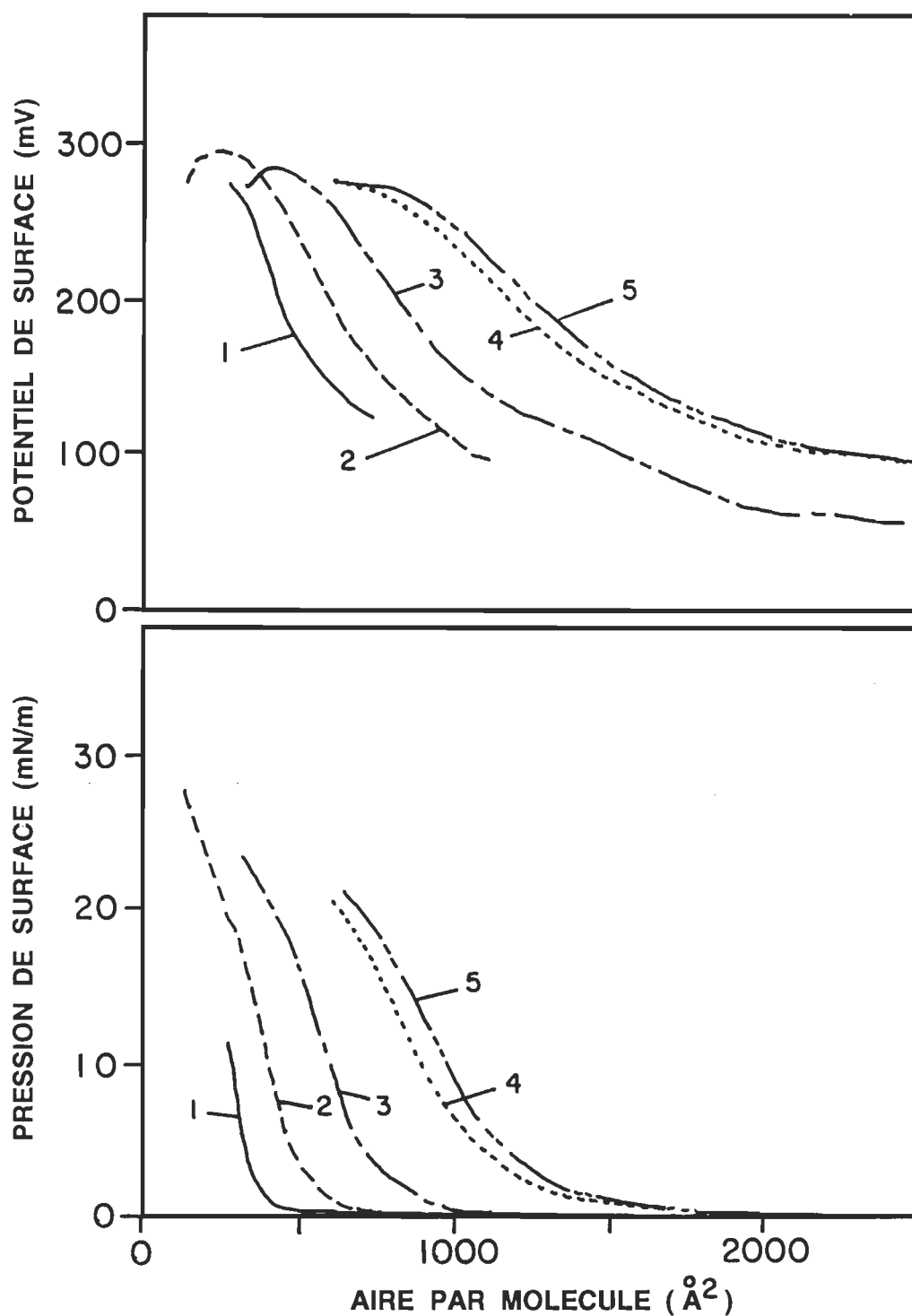


Fig. 13. Effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A du *cyt f*. La protéine est déposée par la méthode de Trumit (courbe 1, voir texte pour les détails) et par la méthode classique à partir d'une solution constituée d'éthanol/eau (1:1, v:v) (2-5). Les quantités déposées dans ce dernier cas sont respectivement de: 202 μg (2), 108 μg (3), 63 μg (4) et 40 μg (5). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

est clairement démontrée par les mesures de radioactivité de surface des protéines marquées. Dans le cas du *cyt c*, Lamarche (1988) a estimé qu'environ 25 % des molécules initialement déposées se sont solubilisées dans la sous-phase. Le paramètre critique qui affecte la désorption d'une protéine de la monocouche est la concentration interfaciale initiale utilisée. Comme une protéine bien étalée correspond à une concentration interfaciale de 1 mg/m^2 , il est conseillé de déposer la moitié de cette quantité -soit 0.5 mg/m^2 - afin d'éviter toute perte des molécules dans la sous-phase. En effet, à grande concentration initiale, les molécules de protéine peuvent exercer les unes sur les autres, une pression qui peut nuire à l'efficacité de leur épandage, et causer en partie leur désorption de la monocouche (MacRitchie, 1986). L'effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A des *cyt c* et *f* est illustré dans les figures 13 et 14. Dans les deux cas, plus le nombre de molécules déposées est faible, plus les isothermes sont décalées vers les grandes aires moléculaires. Pour la surface de notre cuve qui est de 600 cm^2 , la concentration interfaciale initiale devrait être de l'ordre de $30 \mu\text{g}$. Lorsqu'on examine les résultats dans les figures 13 et 14, on constate qu'effectivement les plus grandes aires moléculaires pour les deux *cyt* sont obtenues pour des concentrations de cet ordre, soit: $34 \mu\text{g}$ pour le *cyt c* et $40 \mu\text{g}$ pour le *cyt f*. À l'exception de la méthode de Trurnit (Fig. 13), pour laquelle deux expériences ont été faites, toutes les autres isothermes sont la moyenne d'au moins trois courbes, avec une erreur expérimentale inférieure à $\pm 2 \%$ sur l'aire moléculaire extrapolée à 0 mN/m et de $\pm 10 \text{ mV}$ sur le potentiel de surface. L'accroissement de l'aire moléculaire qui affecte les deux *cyt*, est la preuve d'une plus grande rétention des molécules protéiques à la surface de la cuve. En d'autres termes, l'augmentation de la concentration interfaciale conduit à une nette solubilisation des protéines dans la sous-phase. Un phénomène comparable

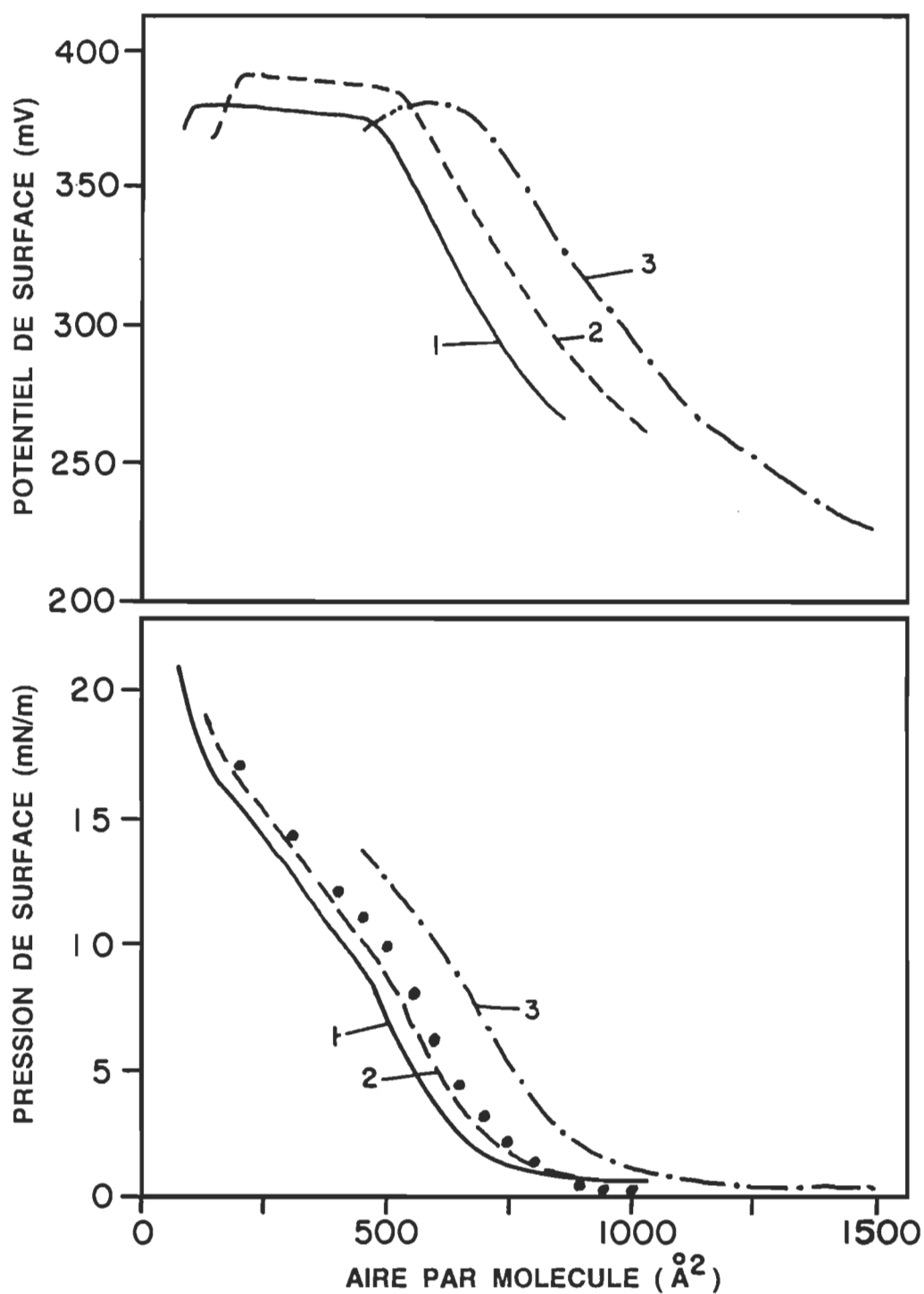


Fig. 14. Effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt c. Les quantités de cyt c déposées sont de: 154 μg (1), 113 μg (2) et 34 μg (3). Les cercles noirs représentent les résultats de Lamarche (1988). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

est également rapporté dans le cas de la glycophorine, une protéine membranaire du globule rouge (Davies *et al.*, 1983). La solubilisation du cyt dans la sous-phase est justifiée par deux observations expérimentales: (i) aux concentrations interfaciales élevées, dès l'épandage des molécules à la surface, une pression de surface d'environ 0.5 à 1 mN/m pour le cyt *c*, et de 0.3 mN/m pour le cyt *f* est enregistrée et demeure même après l'évaporation totale du solvant de déposition et le début de compression. Cette pression que l'on remarque dans la figure 14, est apparemment à l'origine de la diminution de l'aire moléculaire, causée par la désorption des molécules de la monocouche; (ii) à titre comparatif, les résultats de Lamarche (1988) sont présentés à la figure 14, on note une correspondance avec les isothermes obtenues pour les concentrations interfaciales initiales élevées. Dans ce cas aussi, l'épandage de grandes quantités de molécules pourrait partiellement causer leur désorption de la monocouche. En effet, l'isotherme Π -A du cyt *c* obtenue par radioactivité de surface, (c'est-à-dire en calculant l'aire moléculaire en fonction du nombre de molécules détectées par le détecteur de radioactivité), est 25 % plus grande que celle obtenue par la méthode conventionnelle, c'est-à-dire en considérant que le nombre de molécules initialement déposé est constant (Lamarche, 1988). Ceci a conduit l'auteur à conclure qu'environ 25 % du matériel initialement répandu est solubilisé dans la sous-phase. Comme notre isotherme Π -A (Fig. 14, courbe 3) se compare à celle de Lamarche obtenue par radioactivité de surface, (Lamarche, 1988), nous sommes convaincus que l'épandage de la protéine à l'interface air/eau dépend principalement du paramètre critique qui est la concentration interfaciale initiale. Par conséquent, les isothermes des cyt *c* et *f* (Fig. 13, courbe 5, et Fig. 14, courbe 3) caractérisent bien des monocouches où la totalité des molécules est restée à l'interface air/eau en cours de compression.

3. 2. 1. 2. Caractérisation des isothermes Π -A et ΔV -A des cyt *c* et *f*

L'étude abordée ci-dessus nous amène à parler en détail des isothermes Π -A et ΔV -A qui caractérisent les monocouches insolubles des cyt *c* et *f* à l'interface air/eau.

3. 2. 1. 2. 1. Cas du cyt *c*

Les isothermes Π -A et ΔV -A qui caractérisent le cyt *c* sont représentées par les courbes portant le chiffre 3 dans la figure 14. À partir d'une aire moléculaire d'environ 1 500 Å²/molécule, on remarque une augmentation simultanée et progressive de la pression et du potentiel de surface, débutant respectivement à 0 mN/m et 230 mV. L'extrapolation de la courbe de pression de surface à 0 mN/m donne une aire moléculaire de 940 Å²/molécule, ce qui correspondrait à une section moléculaire voisine de celle rapportée pour le cyt *c* natif, soit 906 Å² (Stryer, 1988). Cela montre que, non seulement la totalité des molécules du cyt *c* sont demeurées dans la monocouche, mais qu'en plus, après compression, la molécule a adopté une structure compacte non dépliée comparable à la structure native. En effet, si la molécule était dépliée pour occuper une surface de 1 m²/mg, son aire moléculaire extrapolée correspondrait à 2 056 Å²/molécule. Le changement de pente déterminant le collapse dans l'isotherme Π -A est mieux marqué dans le cas du cyt *c* et se situe à 10 mN/m et une aire moléculaire de 600 Å²/molécule. Dans le cas du potentiel de surface, le plateau à 385 mV apparaît à une aire plus grande, soit à environ 700 Å²/molécule. Sur 15 isothermes, l'erreur expérimentale enregistrée sur l'aire moléculaire est de ± 1 % si elle est calculée pour une moyenne de 3 isothermes consécutives, et de ± 2 %, si toutes les isothermes sont prises en considération. Pour le potentiel de surface, cette erreur se situe entre ± 5 et

± 10 mV dans les meilleures conditions. L'excellente reproductibilité des isothermes Π -A, à ± 1 à 2 % pour les faibles concentrations interfaciales, comparée à plus de 6 % pour les concentrations élevées (Fig.14) utilisées dans notre travail et éventuellement dans celui de Lamarche (1988), montre la bonne stabilité de la monocouche du cyt *c*.

Les principaux travaux concernant les propriétés interfaciales du cyt *c* sont résumés dans le tableau 1 (cf. chapitre 1). Ces travaux ainsi que le nôtre montrent bien que le cyt *c* présente un collapse relativement bas, soit d'une valeur variant entre 9 et 10 mN/m. Cependant, dans le cas de Quinn et Dawson (1970), la valeur relativement grande du collapse (12 à 13 mN/m) pourrait être due à la présence du chlorure de sodium dans la sous-phase (voir section 3. 2. 1. 4.). Plus récemment, un autre groupe de chercheurs a rapporté une valeur plus grande du collapse, soit 16 mN/m (Saint-Pierre-Chazalet *et al.*, 1989). Dans ce cas, l'isotherme Π -A, dont l'aire moléculaire est relative, ne caractérise pas un cyt *c* répandu à l'interface air/eau, mais adsorbé à partir d'une sous-phase excessivement concentrée en protéine (environ 15 mg/l), une situation pour laquelle pourraient résulter des changements structuraux dans la conformation de la molécule (Norde, 1986). Cette condition ajoutée à la source différente du cyt *c* (compagnie FLUKA au lieu de SIGMA pour les autres auteurs), pourrait aussi être la cause des différences observées. En effet, contrairement à ce qui se passe pour le cyt *c* de chez SIGMA, nous n'avons pas réussi à solubiliser celui de chez FLUKA dans le mélange éthanol:eau, 2:1 sans être confronté au problème de sa précipitation. Ce dernier pourrait être différent au niveau de sa structure ou de ses propriétés physico-chimiques.

3. 2. 1. 2. 2. Cas du *cyt f*

Dans la figure 13, on remarque qu'à partir d'une aire moléculaire d'environ $2\,000\text{ Å}^2/\text{molécule}$ et d'un potentiel de surface constant à 280 mV, il y a une augmentation simultanée et progressive de la pression et du potentiel de surface. L'aire moléculaire extrapolée -dans la portion linéaire de la courbe- à 0 mN/m est égale à $1\,200\text{ Å}^2/\text{molécule}$. Comme il n'existe pas de données dans la littérature sur les dimensions de cette protéine, nous ne pouvons pas comparer la section efficace du *cyt f* ainsi déterminée à l'interface air/eau par la méthode de monocouche avec celle qu'elle occuperait en solution ou dans la cellule. Par comparaison avec l'aire moléculaire de $1\text{ m}^2/\text{mg}$ rapportée pour les monocouches de protéine, celle obtenue dans cette étude correspond à environ $0.25\text{ m}^2/\text{mg}$, ce qui suggère que le *cyt f* garde une structure compacte à l'interface air/eau dans les présentes conditions expérimentales. Au sommet de la partie linéaire des isothermes Π -A et ΔV -A, le changement de pente, peu apparent dans l'isotherme Π -A, à 18 mN/m et à 280 mV, est défini comme le collapse de la monocouche du *cyt f*. Le collapse de pression de surface correspond à une aire moléculaire de $755\text{ Å}^2/\text{molécule}$. En effet, contrairement à beaucoup de lipides où le collapse, apparaissant comme un plateau, correspond à la formation d'une phase tridimensionnelle (Gaines, 1966), dans le cas des protéines, il est moins accentué et correspondrait en plus à la dissolution des molécules dans la sous-phase (MacRitchie, 1986, Lamarche, 1988). Par ailleurs, la valeur du collapse des protéines est généralement plus faible que celle des lipides (Fidelio *et al.*, 1986). Dans le cas du *cyt f*, cette valeur demeure inchangée dans les limites d'une erreur expérimentale d'environ $\pm 0.5\text{ mN/m}$ pour la pression de surface et $\pm 10\text{ mV}$ pour le potentiel de surface, et ce, quelle que soit la concentration interfaciale

initiale utilisée. Et comme le potentiel de surface dépend du moment dipolaire perpendiculaire global de la molécule, l'invariabilité du potentiel de surface suggère que la structure moléculaire demeure inchangée à l'interface et que les changements observés dans les isothermes Π -A et ΔV -A par rapport à l'aire moléculaire sont simplement dus à la désorption des molécules dans la sous-phase, provoquée par l'effet de la concentration interfaciale initiale.

Les propriétés interfaciales du *cyt f* déterminées dans la présente étude ne peuvent être comparées à d'autres travaux antérieurs. En effet, la seule étude publiée à ce sujet est celle de Brody *et al.* (1975). Puisque les conditions expérimentales utilisées par ces auteurs -exemple sous-phase très concentrée en phosphate de sodium et nature non indiquée du *cyt f*-diffèrent des nôtres, une comparaison adéquate des isothermes ne peut être faite. Néanmoins, nous avons deux critiques à formuler au sujet de cet article: (i) les auteurs ont utilisé une sous-phase relativement concentrée en sels de phosphate sans que l'on ait précisé leur purification. Comme nous sommes conscients que les impuretés contenues dans de tels produits d'origine commerciale peuvent être à l'origine de sérieux problèmes, même utilisés à très faible concentration (voir chapitre 2), leur purification devient indispensable avant leur utilisation. (ii) L'isotherme de compression du *cyt f* présentée dans cet article ne montre pas de collapse proprement dit, mais un arrêt de compression à environ 10 mN/m ce qui ne lui donne aucune ressemblance avec celles généralement publiées pour les protéines. Là encore, une contamination de surface ne pourrait être écartée.

3. 2. 1. 3. Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes des deux cyt

La stabilité d'une monocouche peut être testée par l'effet causé par un ou plusieurs cycles expansion-compression sur ses isothermes. De tels cycles, peuvent provoquer une hystérèse au niveau de l'aire moléculaire. La diminution de l'aire moléculaire parfois enregistrée, est généralement expliquée par une désorption de certaines molécules de la monocouche qui se retrouvent dans la phase adjacente afin de former une phase tridimensionnelle ou se solubilisent et disparaissent dans la sous-phase (Gaines, 1966; Lamarche, 1988; Birdi, 1989). Afin de vérifier un tel phénomène, nous avons soumis une monocouche de *cyt f* à plusieurs cycles expansion-compression, de façon continue dans le temps. Toutes les expansions sont arrêtées à 0 mN/m, par contre, les recompressions ont été réalisées à des pressions de surface croissantes. Les résultats présentés dans la figure 15 ne montrent aucune hystérèse au niveau des isothermes Π -A et ΔV -A, et ce, quelle que soit la pression d'arrêt, de part et d'autre de la valeur du collapse. Vue la parfaite superposition des isothermes résultant de ces cycles, seules les recompressions finales sont représentées. Ces recompressions ne présentent aucune différence avec les isothermes Π -A et ΔV -A qui caractérisent le *cyt f* présentés ci-dessus, et montrent la grande stabilité de sa monocouche à l'interface air/eau. De plus, il semble évident que la protéine soumise à un tel traitement durant 2 heures, a gardé sa structure compacte intacte et non dénaturée. La même expérience réalisée avec le *cyt c* a donné des résultats comparables à ceux du *cyt f* seulement pour les recompressions arrêtées aux pressions de surface inférieures au collapse. Aux pressions supérieures, toutes les recompressions ont abouti à une diminution progressive et claire de l'aire moléculaire (Fig. 16). Cette

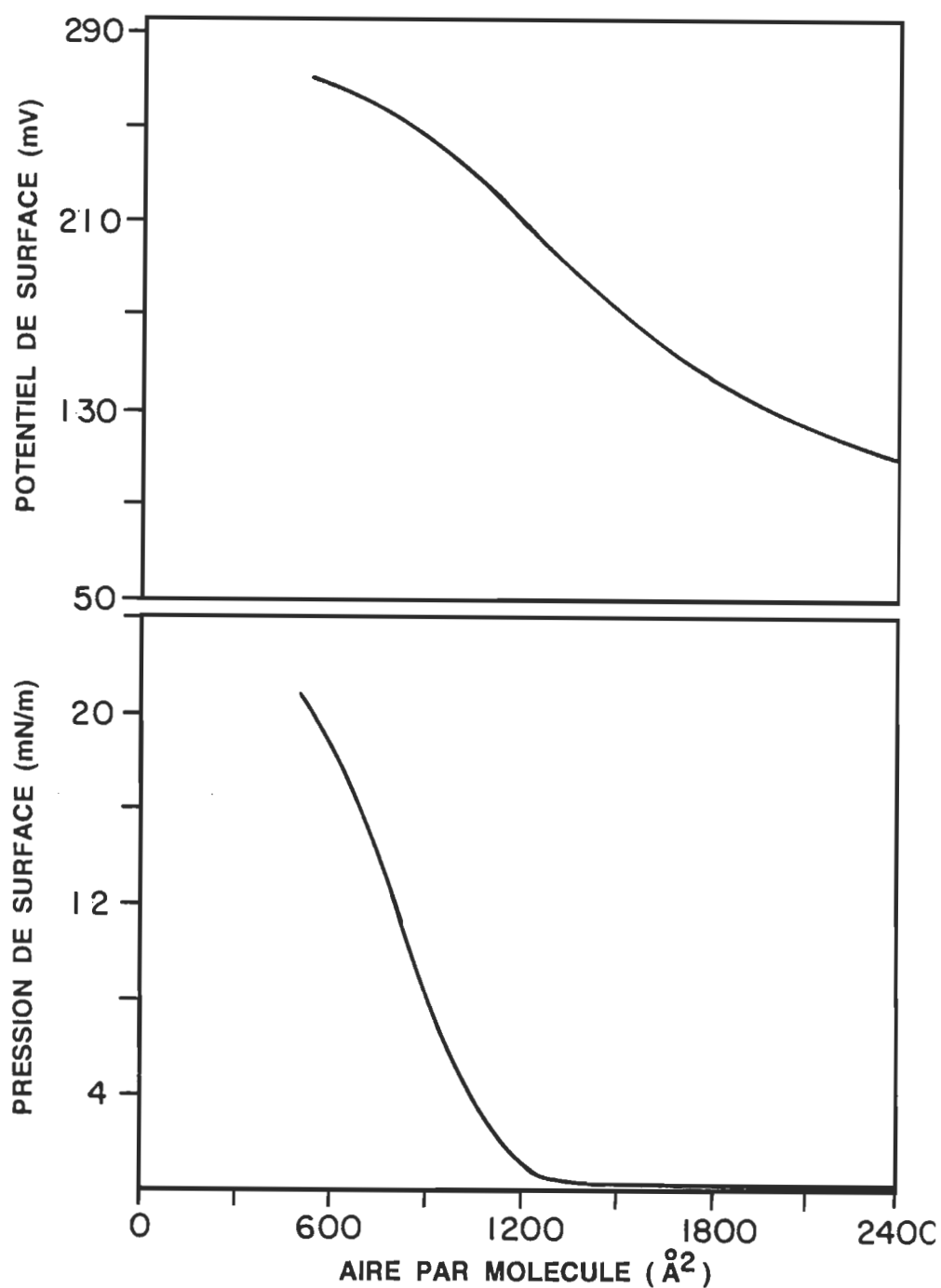


Fig. 15. Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes Π -A et ΔV -A du *cyt f*. Les expansions sont faites jusqu'à 0 mN/m, quant aux recompressions, elles sont arrêtées aux pressions de surface suivantes: 2.0, 4.0, 7.5, 8.4, 11.8, 14.2, 15.8, 19.7, et 21.5 mN/m. Vue la parfaite superposition des courbes résultant de ces cycles, seules les recompressions finales sont représentées. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

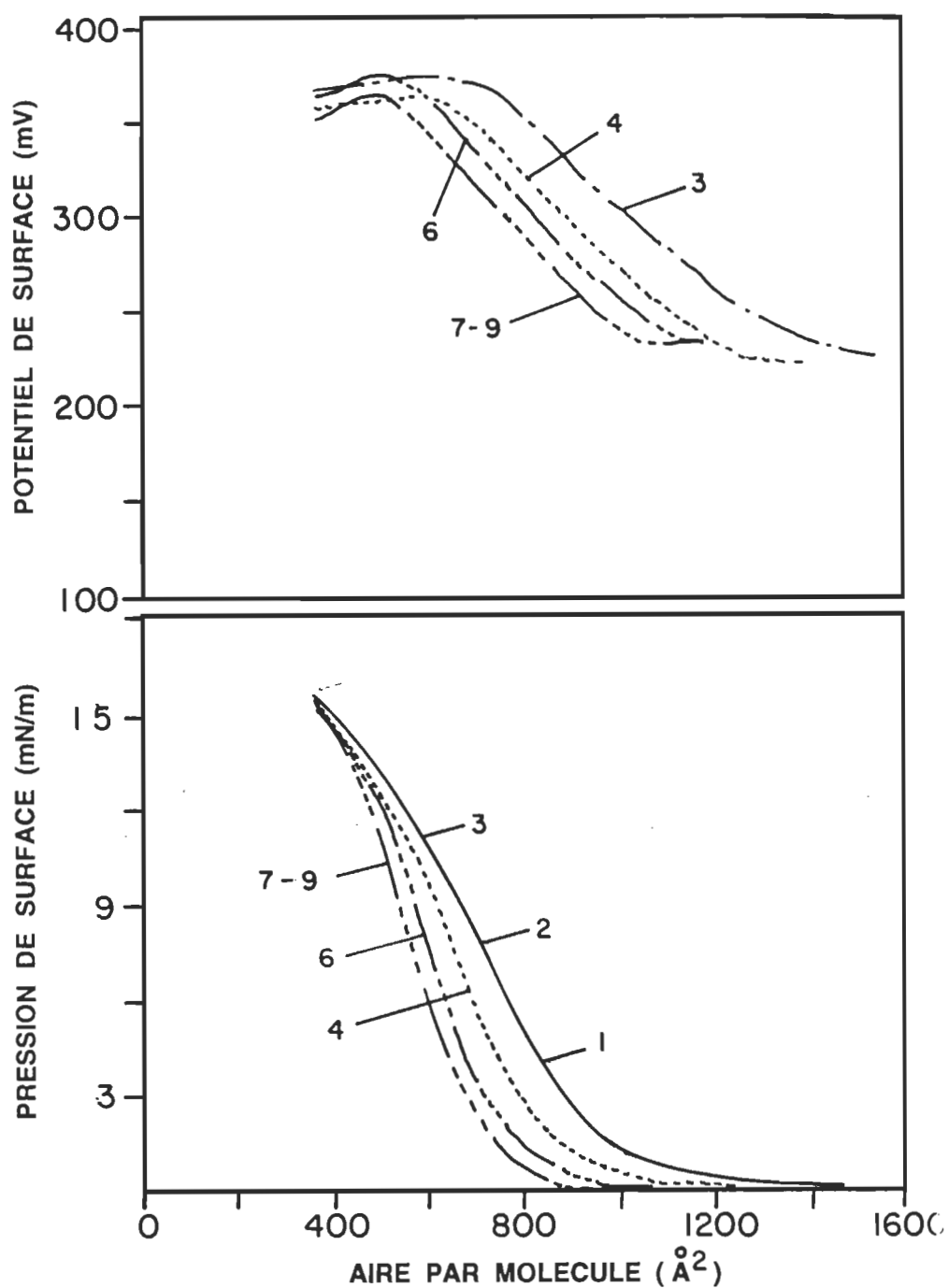


Fig. 16. Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt c. Les expansions sont faites jusqu'à 0 mN/m, quant aux recompressions, elles sont arrêtées aux pressions de surface suivantes: 3.9 mN/m (1), 7.0 mN/m (2) et 15.5 mN/m (3-9). Le chiffre et la flèche indiquent le rang de la recompression et la pression à laquelle celle-ci est arrêtée successivement. Pour la clarté de la figure, seules les recompressions sont représentées. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

diminution qui a affecté les deux isothermes Π -A et ΔV -A, montre la bonne stabilité de la monocouche, comprimée à une pression inférieure au collapse. Par contre, aux pressions supérieures, certaines molécules, qui lors de la compression ont retrouvé leur structure globulaire à grande affinité polaire grâce aux résidus périphériques polaires, tendent à se désorber de la monocouche pour se solubiliser dans la sous-phase. Nous ignorons cependant, si seuls les résidus polaires ou la totalité de ces molécules sont solubilisés dans la sous-phase. En effet, les portions hydrophobes en contact avec la phase aérienne sous l'effet de l'épandage, semblent demeurer à l'interface. Cette hypothèse peut être vérifiée par deux observations: (i) Lorsqu'on dépose une quantité élevée de matériel (p. ex. voir Fig.14, courbe 1), on remarque qu'à partir de 18 mN/m, l'isotherme Π -A change de pente pour tendre à devenir parallèle à l'axe des ordonnées, ce qui semble indiquer la formation d'une structure solide à l'interface air/eau, par exemple une forme coagulée de la protéine. (ii) Dans la phénomène d'apparence légère, est cependant limité, puisque les trois dernières recompressions aboutissent à des isothermes Π -A et ΔV -A parfaitement superposables. Par ailleurs, le potentiel de surface -des valeurs du début de compression jusqu'au collapse- demeure inchangé au cours de ces cycles, montrant ainsi que la structure de la protéine demeure comparable à celle du *cyt c* natif. Des études similaires incluant la radioactivité de surface publiées par d'autres chercheurs, ont également démontré le phénomène de désorption de la protéine et sa solubilisation dans la sous-phase, et ce, sous l'effet de la compression de la monocouche aux grandes pressions de surface (MacRitchie et Ter-Minassian-Saraga, 1984; Lundh et al., 1988).

3. 2. 1. 4. Tests de dénaturation du cyt *c* en monocouche

Toute l'information nécessaire pour qu'une protéine aussitôt synthétisée se plisse correctement pour avoir sa conformation native et biologiquement active, se trouve au niveau de sa structure primaire. Lorsque cette protéine est soumise à un traitement drastique, comme une forte température, un acide fort ou une base forte, elle perd sa conformation native et son activité biologique, phénomène connu sous le nom de dénaturation. Dans le domaine d'étude des monocouches, le terme dénaturation correspond aux modifications conformationnelles que subit une protéine native généralement globulaire, hydro ou liposoluble, lorsqu'elle est répandue à la surface de l'eau pure ou d'un tampon à propriétés dénaturantes. L'effet dénaturant provoqué par la surface est connu sous le terme de dénaturation de surface. Elle est essentiellement due à une perte des structures tertiaires et secondaires de la protéine. Dans ces conditions, le critère principalement observé est l'augmentation de l'aire occupée par la molécule -due à un dépliement partiel ou total-, comparée à sa section native. Afin de déterminer les indices qui peuvent nous informer sur la dénaturation de la protéine à l'interface air/eau, nous avons soumis les cyt *c* et *f* à deux tests. Le premier, consiste à laisser la protéine pendant une longue durée à 0 mN/m avant de la comprimer et noter les changements qui peuvent en résulter et en affecter les isothermes. Les résultats illustrés dans la figure 17, montrent que deux changements visibles particulièrement sur les isothermes Π -A affectent le cyt *c* comprimé deux heures après son épandage. Le premier, est le léger, mais apparent décalage de l'isotherme vers les grandes aires moléculaires, tandis que le second, qui est plus marqué, est l'augmentation de la valeur du collapse, qui passe de 10 à 12.5 mN/m. Comme l'expérience répétée trois fois, a donné une excellente

reproductibilité à $\pm 1\%$ de l'aire moléculaire et à $\pm 2\%$ de la pression de surface, les changements observés résultent bien des changements conformationnels qui ont affecté la molécule du cyt c restée pendant deux

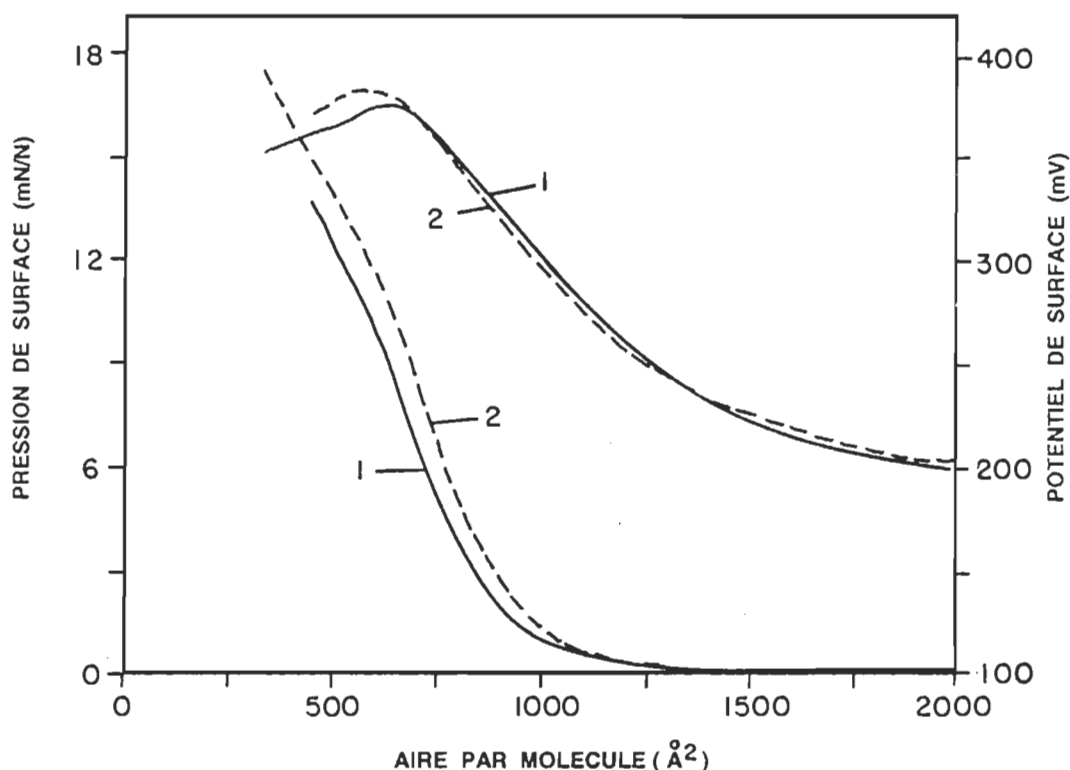


Fig. 17. Effet de la durée passée par la monocouche à 0 mN/m sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt c. La monocouche est comprimée aussitôt le solvant évaporé (1) et deux heures après (2). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

heures à 0 mN/m. L'analyse du potentiel de surface a montré que, contrairement à la pression de surface, celui-ci est demeuré inchangé dans les limites de l'erreur expérimentale. En outre, puisque le potentiel de surface est proportionnel au moment dipolaire perpendiculaire global de la molécule (équation 6), sa constance suggère que le changement conformationnel qui affecte le cyt c à faible pression de surface n'est pas très important pour causer une dénaturation poussée de la protéine. Cette légère dénaturation semble du même ordre que celle observée auparavant, dans le cas où la molécule a été soumise à plusieurs cycles compression-

expansion.

Les changements les plus marqués qui affectent les propriétés interfaciales des deux cyt sont observés à la suite de l'ajout du chlorure de sodium dans la sous-phase. Les résultats présentés dans les figures 18 et 19 le démontrent très bien. Dans le cas du cyt *f* (Fig. 18), l'augmentation graduelle de la concentration du NaCl dans la sous-phase, n'aboutit à un changement perceptible sur les isothermes qu'à partir d'une concentration supérieure à 1 mol/l. Aux concentrations plus faibles, 0.1 et 0.5 mol/l, les isothermes Π -A et ΔV -A demeurent inchangées, donc comparables à celles du cyt *f* déterminées en absence de sel dans la sous-phase. À 1 mol/l, l'effet du sel se manifeste par une légère augmentation de l'aire moléculaire, sans toutefois que la pression au collapse et le potentiel de surface soient modifiés. Les changements les plus marqués, surviennent à la concentration de 4 mol/l où on remarque, non seulement une augmentation appréciable de l'aire moléculaire, mais en plus, un accroissement de la pression au collapse (Fig. 18, courbe 5). Ainsi, l'aire moléculaire limite et la pression au collapse passent respectivement de 1 200 à 1 600 Å²/molécule et de 18 à 28 mN/m lorsque la concentration de la sous-phase est accrue de 0 à 4 moles de NaCl par litre. Par ailleurs, le point de saturation du potentiel de surface, inchangé pour les concentrations inférieures à 1 mol/l, s'est accru d'environ 50 mV.

L'effet du sel est encore plus marqué sur les isothermes du cyt *c* (Fig. 19). Cette sensibilité à la présence du NaCl dans la sous-phase se révèle dès la plus faible concentration utilisée, soit 0.1 mol/l. En effet, à partir de cette concentration et pour toutes les concentrations supérieures, on note une augmentation progressive de la pression du collapse, si bien qu'en passant de 0 à 4 mol/l, l'aire moléculaire limite et la pression au collapse voient leur

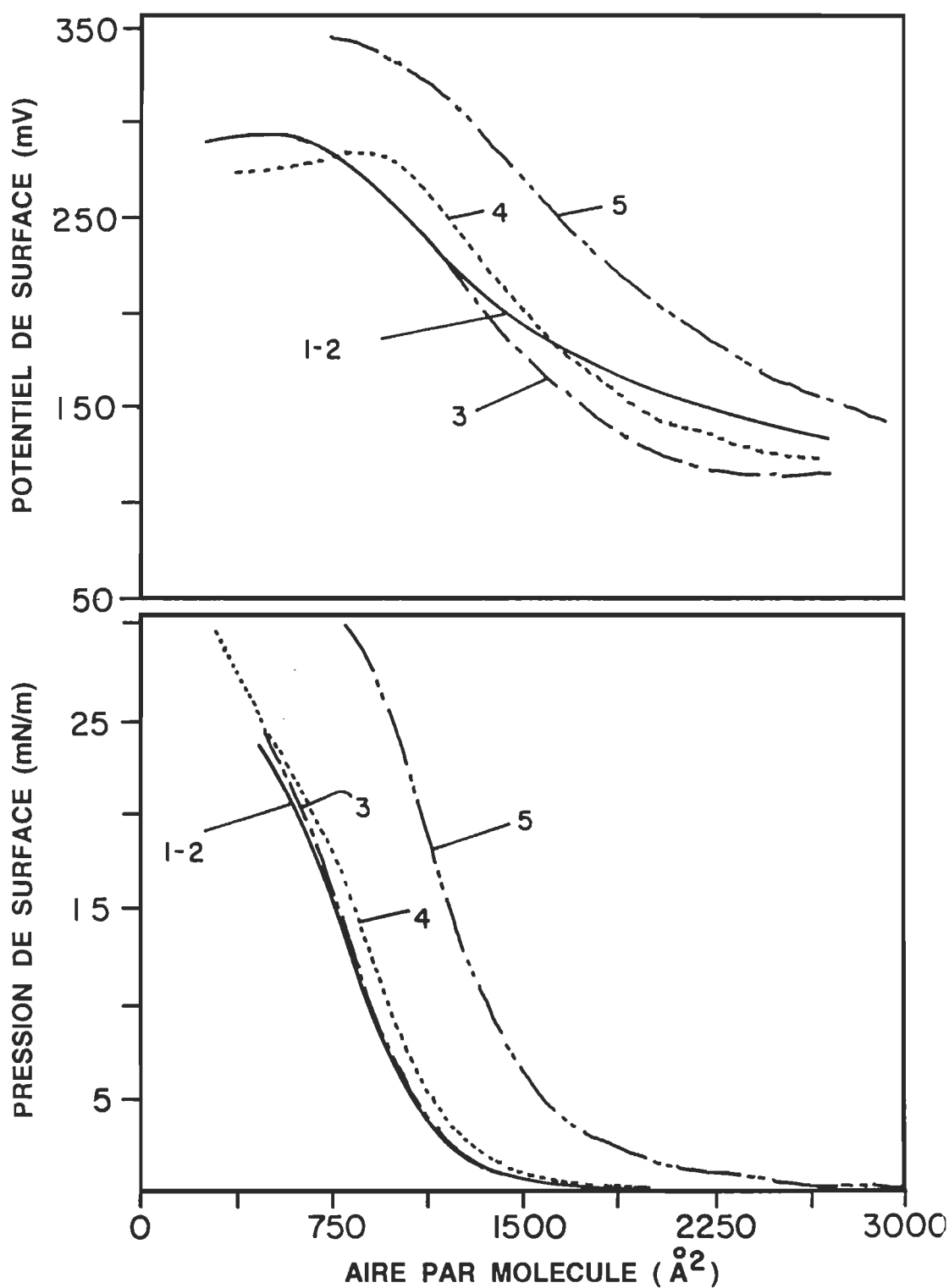


Fig. 18. Effet de la concentration du NaCl de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*. Cette concentration est de: 0 M (1), 0.1 M (2), 0.5 M (3), 1 M (4) et 4 M (5). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

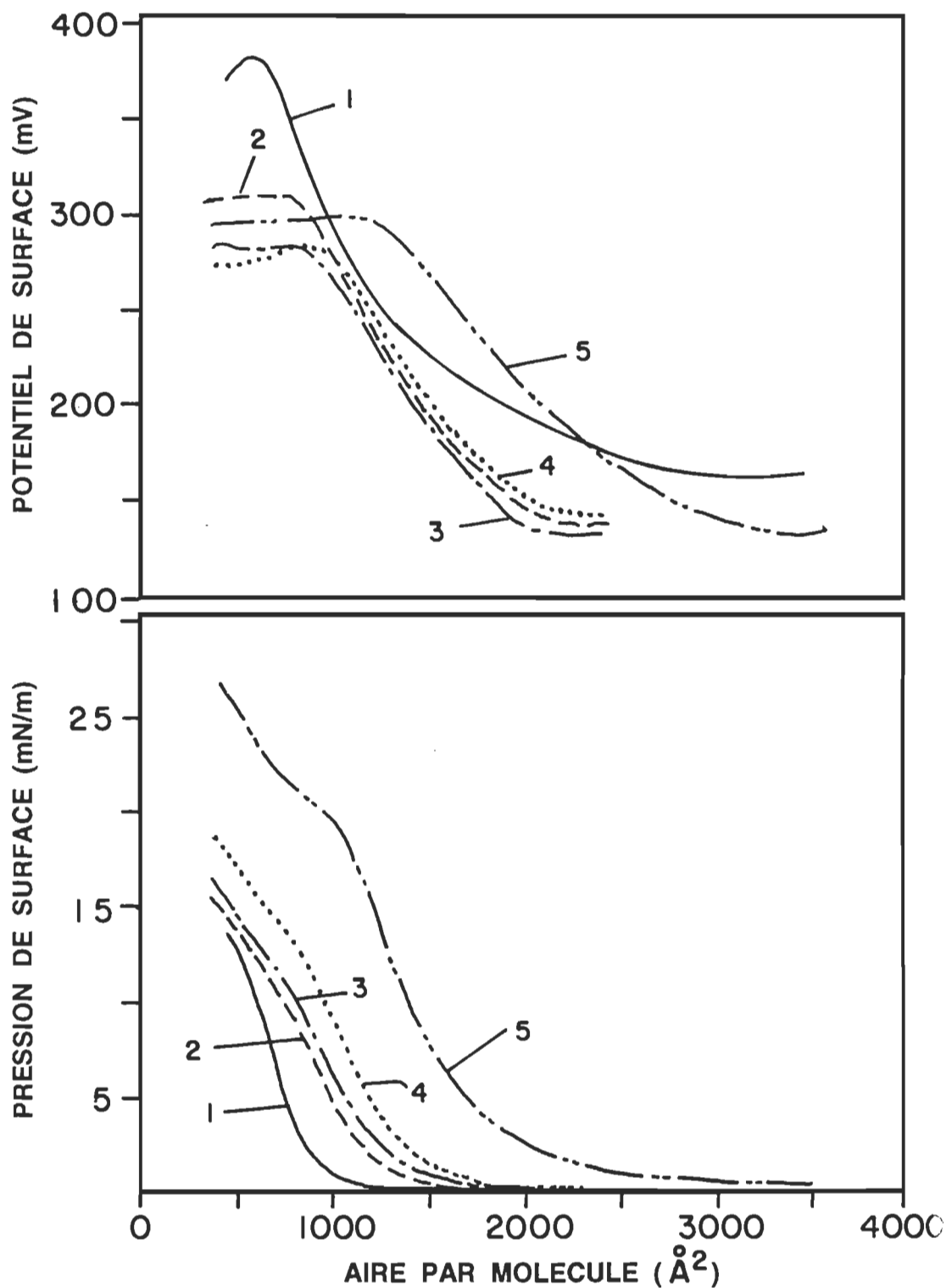


Fig. 19. Effet de la concentration du NaCl de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *c*. Cette concentration est de: 0 M (1), 0.1 M (2), 0.5 M (3), 1 M (4) et 4 M (5). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

valeur presque doubler: celles-ci passent respectivement de 940 à 1 750 Å²/molécule, et de 10 à 18 mN/m. La modification du potentiel de surface de la molécule est intimement liée à l'augmentation de l'aire moléculaire. De même, pour le cyt *f*, c'est à 4 mol/l de sel qu'on a observé une augmentation évidente de l'aire moléculaire et du collapse, accompagnée d'une nette diminution du potentiel de surface. Par contre, dans le cas du cyt *c*, ces changements simultanés surviennent, même, à la plus faible concentration de sel utilisée, soit 0.1 mol/l. Au-dessus de cette concentration, la valeur du potentiel de surface au niveau du plateau est réduite d'environ 85 mV, pour se stabiliser à environ 300 mV.

Dans une étude antérieure, Shasovnikova *et al.* (1983) ont rapporté l'effet de la concentration du NaCl introduit dans la sous-phase sur les isothermes Π -A de l'immunoglobuline humaine. Comparativement à notre travail, cette influence du sel se manifeste par une augmentation de l'aire moléculaire et de la pression de surface au plateau, phénomène que ces auteurs ont expliqué par la dénaturation de la molécule dont les structures secondaires et tertiaires sont perturbées. Dans un autre travail, le dédoublement des valeurs de la pression au collapse et de l'aire moléculaire limite, noté lors de la dénaturation de la toxine de diphtérie en monocouche en portant le pH de la sous-phase où elle est répandue de 7.4 à 5, est expliqué par une transition de la protéine d'une conformation globulaire à une structure moins compacte et plus stable à l'interface (Demel *et al.*, 1991). Par ailleurs, la valeur élevée de la pression au collapse, observée dans le cas du cyt *c* (Quinn et Dawson, 1970) serait aussi causée par la présence du NaCl dans la sous-phase. Comme l'aspect globulaire de la protéine native, ainsi que les éléments ordonnés de ses structures secondaires incluant les hélices- α et les structures β , sont stabilisés grâce

aux liens hydrogènes des groupements carbonyles et amide de la chaîne polypeptidique d'un côté ou entre les résidus polaires et les molécules d'eau de l'autre (Stryer, 1988; Rawn, 1989), la présence de sel en grande concentration pourrait provoquer la perturbation de ces liens et changer la conformation de la molécule.

Les transformations manifestées par la protéine sous l'influence de la concentration du sel dans la sous-phase sont expliquées par le phénomène de dénaturation comme rapporté dans le cas des protéines adsorbées à l'interface air/eau à partir d'une solution aqueuse (Phillips, 1977; Graham et Phillips, 1979 a-c; MacRitchie, 1986). Dans ce cas, la protéine perd en partie, ou en totalité, ses structures tertiaires et secondaires pour se partitionner entre les phases aérienne et aqueuse sous forme de segments, de trains et de queues, et occuper -comme souvent rapporté- une aire de $1 \text{ m}^2/\text{mg}$ (voir chapitre 1). L'augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse dans le cas des deux cyt est un signe de l'apparition de changements conformationnels dans la molécule. Comme les portions hydrophobes (p. ex. hélices- α ou feuillets- β) sont enfouis dans le coeur de la protéine en solution, une fois à l'interface air/eau et sous l'effet de la dénaturation causée par la surface, celles-ci peuvent être partiellement exposées à la phase aérienne. Il peut en résulter une augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse, causée par dépliement de la molécule. Dans ces conditions, l'augmentation du collapse pourrait être expliquée par le fait que, sous l'effet de la compression, l'éjection de ces éléments additionnels hors de la monocouche qui surviendrait au collapse, nécessiterait un apport énergétique additionnel. Les figures 18 et 19 montrent une certaine proportionnalité entre l'augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse. En augmentant la concentration

en sel de la sous-phase de 0 à 4 mol/l, on note que l'aire limite et la pression au collapse sont simultanément multipliés par un facteur de 1.5 pour le cyt *f* et de 2 pour le cyt *c*. La plus grande aire moléculaire limite enregistrée correspond à 1 m²/mg pour le cyt *c* et 0.33 m²/mg pour le cyt *f*, valeurs qui montrent bien que la structure du cyt *f* est apparemment moins affectée par le sel que celle du cyt *c*. En effet, 1 m²/mg de cyt *f* correspondrait à une aire moléculaire d'environ 4 800 Å²/molécule. Cependant, dans les deux cas la protéine est dénaturée puisqu'aux grandes concentrations de sel dans la sous-phase et à la fin de la compression, la monocouche de protéine semblait dans un état coagulé. En effet, dans les conditions normales, à la fin de chaque expérience, au moment du nettoyage de la monocouche (lipidique ou protéique) et ce, à l'aide d'une pipette Pasteur reliée à un système de succion à vide, la monocouche est aspirée instantanément, provoquant un retour rapide de la pression de surface à 0 mN/m. Toutefois, dans le cas mentionné ci-dessus où la protéine est apparemment coagulée, l'aspiration de la monocouche durait plus longtemps, soit au moins une minute.

L'effet du sel sur les protéines globulaires en solution est connu sous les noms de dissolution par les sels ou "salting-in", et relargage de la protéine ou "salting-out" (Lehninger, 1975). Ces phénomènes se résument comme suit: à faible concentration les sels agissent en élevant la solubilité d'une protéine, d'où le "salting-in". Au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en sels, la solubilité de la protéine diminue aux dépens de son relargage et sa précipitation sous sa conformation native. Bien que la base physicochimique de cette précipitation demeure complexe, une explication de ce processus peut être avancée sur la base d'une extraction de l'eau d'hydratation des molécules protéiques lors de l'emploi de fortes

concentrations en sels, conduisant ainsi à une solubilité moindre (Lehninger, 1975). Une analogie peut être établie avec l'effet du sel sur la protéine en monocouche, où l'éventuelle déshydratation de la molécule conduirait à la précipitation de ses résidus à l'interface air/eau. Ce phénomène favorisant l'adsorption des divers segments de la protéine, coopèrerait avec l'effet de surface à la dénaturation de la molécule.

Parallèlement à l'augmentation de l'aire moléculaire et de la pression de surface au collapse, la modification du potentiel de surface manifestée par une élévation du plateau d'environ 50 mV dans le cas du *cyt f* et par une diminution d'environ 85 mV dans le cas du *cyt c*, pourrait également résulter du phénomène de dénaturation. Le changement conformationnel de la protéine pourrait induire une réorientation globale du moment dipolaire perpendiculaire de la molécule dont dépend le potentiel de surface. Si la modification du potentiel de surface était uniquement due à la présence d'ions dans la sous-phase, la neutralisation des charges positives du *cyt c* à pH = 8 aurait donné une isotherme Π -A à aires moléculaires plus faibles et ce, à cause de l'élimination des interactions électrostatiques répulsives entre les molécules chargées de la monocouche.

3. 2. 1. 5. Conclusion

Les propriétés interfaciales des *cyt f* et *c* déterminées dans ce travail, ont montré que les deux protéines forment une monocouche stable à l'interface air/eau. Une comparaison entre la section du *cyt c* connue par diffraction aux rayons X et son aire moléculaire déterminée en monocouche, a montré une excellente corrélation ce qui expliquerait que la molécule pourrait conserver sa structure native à l'interface air/eau.

Les courbes de compression des deux *cyt* sont hautement influencées

par la concentration interfaciale initiale choisie. Pour chaque protéine, il existe une concentration critique (environ 0.5 mg/m^2) au-dessus de laquelle, une partie des molécules déposées est solubilisée dans la sous-phase.

Les cycles compression-expansion ont montré que le *cyt f* a une conformation plus compacte et moins sensible à la désorption et à la dénaturation que le *cyt c*.

L'ajout de sel à fortes concentration dans la sous-phase induit des changements conformationnels marqués au niveau de la molécule protéique. Ces changements qui sont manifestés par l'augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse, signalent la dénaturation de la protéine. De plus, l'effet du sel, les cycles compression-expansion, ainsi que le maintien de la protéine à 0 mN/m pendant une longue durée, nous ont permis de détecter grâce aux variations de la pression au collapse et de l'aire moléculaire la dénaturation de la protéine à l'interface air/eau.

En termes de perspective, afin de mieux cerner le phénomène du changement conformationnel de la protéine, de l'état natif à l'état dénaturé, nous proposons une étude par la technique FTIR à l'interface air/eau. Ainsi, puisque cette technique est assez pertinente, elle nous éviterait de travailler avec une protéine dénaturée dans les modèles qui reconstituent les systèmes biologiquement actifs.

3. 2. 2. Adsorption du *cyt c* à une monocouche de DOPC

Dans la plupart des études concernant l'interaction lipide-protéine à l'interface air/eau, la protéine hydrosoluble est injectée dans la sous-phase sous une monocouche lipidique. Les mesures concernent alors, soit la variation de la pression de surface à aire moléculaire constante, soit

l'inverse. Ces mesures qui modélisent l'aspect fonctionnel ou structural de la protéine visent, soit l'étude du complexe lipide-enzyme comme dans le cas de la digestion enzymatique d'une monocouche de phospholipide par une phospholipase, soit l'étude de l'aspect conformationnel de la protéine dans le complexe lipide-protéine à l'interface air/eau. Ce dernier point a pu être examiné à maintes reprises en adsorbant une protéine telle que le *cyt c* à une monocouche lipidique (Quinn et Dawson, 1969a-b, 1970; Teissie, 1981; Lamarche, 1988). Ainsi, l'adsorption du *cyt c* à une monocouche de DOPC ou de PC d'oeuf, a montré que la protéine ne s'adsorbe pas (Quinn et Dawson 1969; Lamarche, 1988) ou s'adsorbe, sans toutefois pénétrer (Teissie, 1981) dans la monocouche de phospholipide comprimée à une pression de surface de 20 mN/m. Aux pressions inférieures, à l'aide d'une série de cycles compression-expansion, il a été démontré que la protéine est incorporée à la monocouche lipidique lors de l'expansion et la recompression jusqu'à 14 mN/m, au-delà, elle est progressivement éjectée dans la sous-phase (Lamarche, 1988). Au-dessus de 20 mN/m, les propriétés mesurées sont simplement celles du lipide. L'étude présentée dans cette section, c'est-à-dire l'adsorption du *cyt c* à une monocouche de DOPC, ne représente pas l'objectif de notre travail. Les résultats obtenus à l'aide de cette technique seront utilisés uniquement dans un cadre comparatif avec nos travaux sur les interactions lipide-protéine, où les constituants sont mélangés à l'interface air/eau (voir section 3. 2. 3). Les détails de cette technique d'adsorption dont nous présenterons ci-dessous une description sommaire, figurent dans la thèse de Lamarche (1988).

Après avoir comprimé la monocouche lipidique à 20 mN/m, la protéine est injectée à divers points dans la sous-phase (Fig. 20). La protéine est ensuite homogénéisée dans la sous-phase par une série de va-et-

vient (10 fois) d'un prisme creux dont la base repose sur le fond de la cuve et dont le sommet se situe à environ 1 mm de la surface. La barrière mobile est ensuite déplacée à sa position de départ (expansion), puis en sens inverse (recompression) jusqu'à une position finale (Fig. 20). Nous avons réalisé une série d'expériences en injectant le *cyt c* sous une monocouche de DOPC initialement comprimée à 20 mN/m. Comme nous savons que l'adsorption de la protéine peut dépendre de certains paramètres, comme par

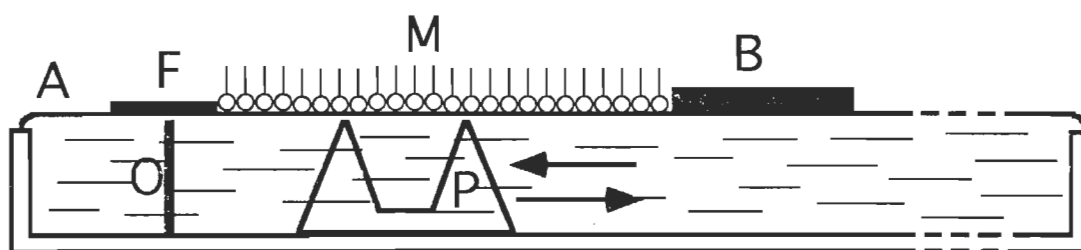


Fig. 20. Représentation schématique du dispositif d'homogénéisation de la protéine injectée sous une monocouche lipidique (M) -comprimée à 20 mN/m-, à l'aide de mouvements horizontaux (flèches) d'un prisme creux (P). Les autres éléments sont: la barrière mobile (B), le flotteur (F), et l'obstacle (O) contre le passage de la protéine au compartiment de référence (A).

exemple la variation de sa concentration ou la méthode de son introduction dans la sous-phase, nous avons entrepris d'étudier l'incorporation du *cyt c* à la monocouche lipidique, en tenant compte de ces paramètres. Deux concentrations, 0.5 et 1 mg/l, ainsi que deux méthodes d'injection de la protéine, soit dans le creux du prisme, soit dans toute la partie de la cuve localisée sous la monocouche, ont été utilisées. Dans les deux cas, la protéine a été homogénéisée dans la sous-phase tel que décrit ci-dessus. Qualitativement, les résultats illustrés dans la figure 21 pour les deux concentrations mentionnées, s'accordent bien entre eux et avec le travail de Lamarche (1988) pour révéler une incorporation du *cyt c* au cours de l'expansion (20 à 0 mN/m) et de la recompression (0 à 14 mN/m). Au-

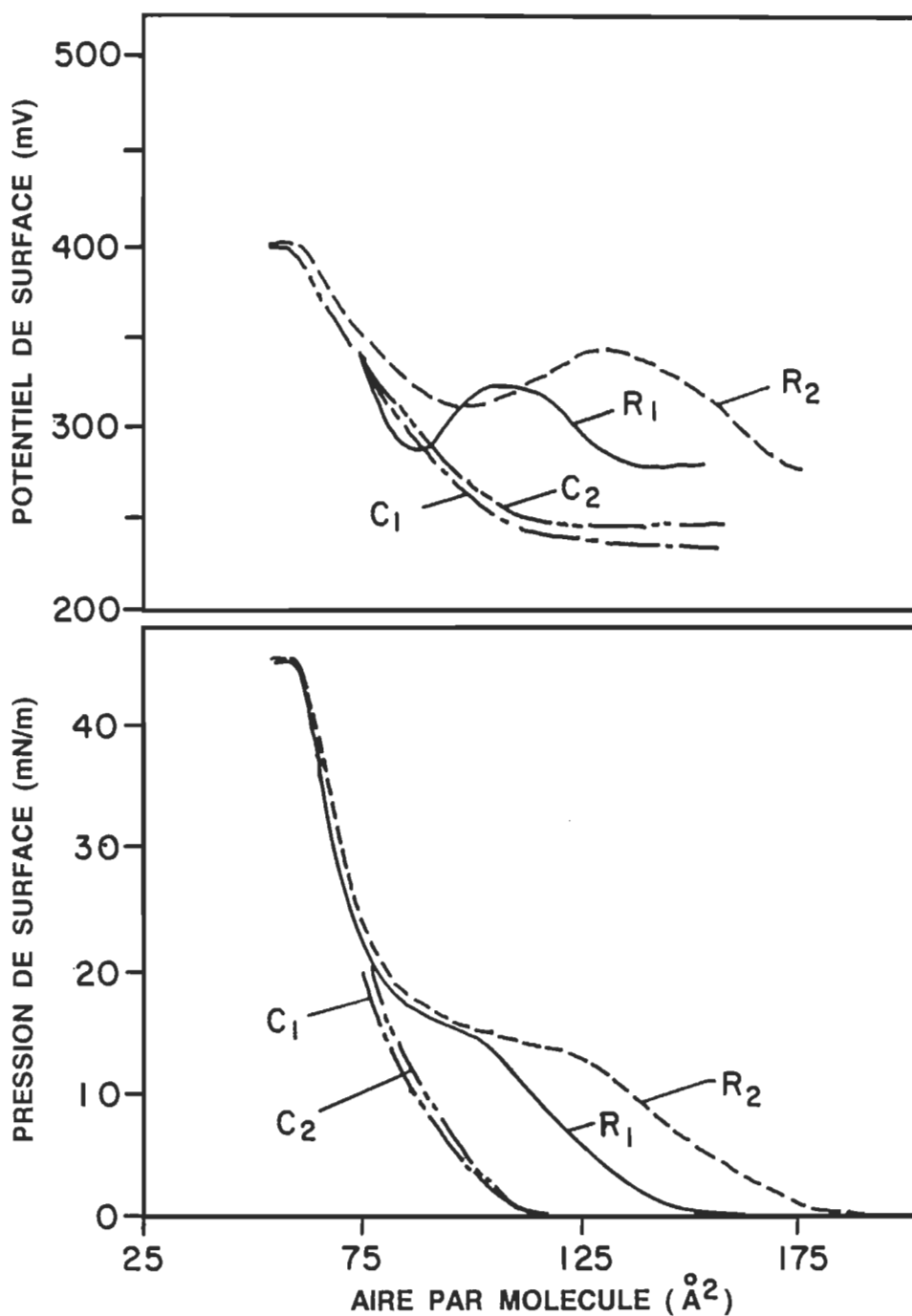


Fig. 21. Adsorption du cyt *c* injecté dans la sous-phase à une monocouche de DOPC. La DOPC est d'abord comprimée à 20 mN/m (C1 et C2). Après injection du cyt *c* et expansion jusqu'à la position initiale de la barrière (courbes non représentées pour la clarté de la figure), la monocouche est finalement recomprimée (R1 et R2) à une position finale. Les chiffres 1 et 2 sont respectivement attribués à 0.5 et 1 mg de cyt *c*. Pour les autres détails, voir texte. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

dessus de 14 mN/m, le changement de pente dans les courbes de pression et de potentiel de surface, ainsi que le retour des isothermes aux propriétés interfaciales du lipide aux pressions supérieures à 20 mN/m, sont la preuve de la désorption de la protéine dans la sous-phase. Les propriétés interfaciales de la DOPC déterminées dans cette étude, seront décrites dans la section suivante (3. 2. 2). D'un point de vue quantitatif, la figure 21 montre que l'adsorption de la protéine à la monocouche lipidique augmente avec la concentration de la protéine dans la sous-phase. Ainsi, l'augmentation de l'aire moléculaire correspondant à l'incorporation de la protéine en expansion et en recompression, va en parallèle avec l'augmentation de sa concentration dans la sous-phase. Il en serait de même si la protéine était recomprimée longtemps après l'expansion, car l'adsorption de la protéine à l'interface air/eau ou à une monocouche lipidique, est un phénomène cinétique (cf. chapitre I). L'effet du temps sur la quantité de protéine adsorbée a d'ailleurs été démontré dans la thèse de Lamarche (1988), où la recompression finale du cyt *c* après une série de cycles compression-expansion du film mixte a abouti à la plus grande aire moléculaire et donc à la plus grande quantité de protéine incorporée.

La méthode d'injection a également entraîné des différences dans les résultats. Les isothermes de la figure 21 sont obtenues suite à l'injection de la protéine dans le creux du prisme. Lorsque l'injection est réalisée au-dessous de toute la surface occupée par la monocouche, soit à l'intérieur et à l'extérieur du creux du prisme, l'aire moléculaire obtenue pour le film mixte est beaucoup plus faible que celle mentionnée ci-dessus. Pour 1 mg de protéine, les courbes résultantes non représentées pour fin de clarté de la figure, sont presque confondues avec celles obtenue pour 0.5 mg dans la figure 21.

3. 2. 3. Interaction lipide-protéine: épandage des deux constituants à l'interface air/eau.

L'interaction lipide-protéine est fondamentale pour l'exercice des fonctions de la membrane biologique. Ces deux constituants contribuent à poids égal dans l'architecture membranaire. En revanche, considérant le nombre de molécules de chaque espèce, les protéines représentent une fraction molaire infime de l'ordre de quelques unités pour cent. Afin de respecter de telles proportions et d'étudier la thermodynamique du mélange dans le modèle de monocouche qui sert à simuler une membrane biologique, seule l'épandage respectif des deux constituants ou de leur mélange, permet une étude précise de l'interaction lipide-protéine.

Dans le travail qui suit, l'interaction lipide-protéine sera étudiée dans divers systèmes binaires où les deux constituants seront mélangés à la surface de l'eau. Comme les lipides et les protéines concernés ne sont pas solubles dans les mêmes solvants, nous procéderons à l'épandage respectif des molécules lipidiques et protéiques comme décrits dans le chapitre 2. Avant d'épandre la protéine, il est essentiel de s'assurer de l'évaporation totale du solvant organique dans lequel les molécules lipidiques sont répandues, sinon la dénaturation de la protéine devient inévitable. Dans ce dernier cas, nous avons constaté à la suite d'une compression, une augmentation continue du potentiel de surface sans détection d'aucun signal de pression de surface.

L'objectif de ce travail est d'étudier la miscibilité, la stabilité et l'interaction dans divers systèmes lipide-protéine ainsi que l'influence de certains paramètres tels que la nature et l'état physique du lipide, la complexité de la tête polaire, de même que la charge que celle-ci; ou la

partie polaire que porte la protéine. Ces paramètres peuvent être étudiés dans les systèmes lipide-protéine en utilisant comme protéine le *cyt c* ou *f*, et un vaste choix de lipides comme par exemple les phospholipides qui entrent principalement dans la composition de la plupart des membranes biologiques. Les phospholipides synthétiques représentent des molécules de choix puisqu'on peut les modifier soit au niveau de la tête polaire, soit au niveau de la chaîne d'acide gras. Nous pourrions étudier l'influence de l'état physique de la monocouche lipidique sur la miscibilité avec la protéine en utilisant une phosphatidylcholine à 18 carbones, saturée (la DSPC) ou insaturée (la DOPC). L'influence de la charge de la tête polaire est examinée en utilisant une phosphatidylsérine insaturée à 18 carbones, la DOPS. Celle-ci entre dans la composition du feuillet interne de la membrane cellulaire. À pH physiologique elle porte une charge négative qui peut interagir électrostatiquement avec la partie polaire chargée de la protéine.

L'effet de ces lipides synthétiques peut être comparé à celui d'autres lipides membranaires comme le MGDG et la Chl *a* dont la tête polaire est plus complexe.

3. 2. 3. 1. Etude de l'interaction des *cyt c* et *f* avec la phosphatidylcholine: influence de l'état physique du lipide

Dans la présente section, nous étudierons l'effet de la présence d'une double liaison au niveau de la chaîne d'acide gras de la phosphatidylcholine (DOPC) sur l'interaction de la protéine avec ce lipide en comparaison avec son homologue saturé, la DSPC. L'interaction électrostatique est exclue dans ce cas, puisque la PC est un lipide neutre.

3. 2. 3. 1. 1. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPC

Les isothermes Π -A et ΔV -A qui caractérisent la DOPC pure dans ce travail sont représentées dans la figure 22. Ces courbes sont des moyennes établies à partir de 25 expériences faites à partir de 8 échantillons pesés à partir de deux lots achetés séparément. Pour chaque échantillon, une courbe moyenne est établie et, l'écart maximal observé entre les moyennes est de $3 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour l'aire moléculaire, et de 20 mV pour le potentiel de surface. Pour un même échantillon, l'erreur observée sur une moyenne d'au moins 3 isothermes est de $\pm 1 \%$ pour l'aire moléculaire extrapolée à pression nulle et de $\pm 5 \text{ mV}$ pour le potentiel de surface.

L'isotherme Π -A de la DOPC dont la pression de surface débute à partir d'une aire moléculaire de $113 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, est caractéristique d'un état liquide expansé, causé par la présence d'une double liaison dans chaque chaîne d'acide gras. Le collapse qui correspond à une saturation de pression, est situé à une pression de surface de $46.0 \pm 0.5 \text{ mN/m}$ et une aire moléculaire de $56 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Ces valeurs sont comparées à celles obtenues par d'autres chercheurs ayant utilisé des conditions expérimentales comparables aux nôtres (tableau 4). L'analyse de ces valeurs montre la bonne concordance entre notre isotherme et celle déterminée par d'autres chercheurs, les faibles différences se situent à l'intérieur de l'erreur expérimentale.

Parallèlement à l'isotherme Π -A, l'isotherme ΔV -A montre également une augmentation progressive en fonction de la diminution de l'aire moléculaire (Fig. 22). Le début de cette augmentation de ΔV à 255 mV coïncide bien avec l'aire de $113 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, valeur où la pression de surface est détectée. À l'aire où la pression de surface collapse, le potentiel

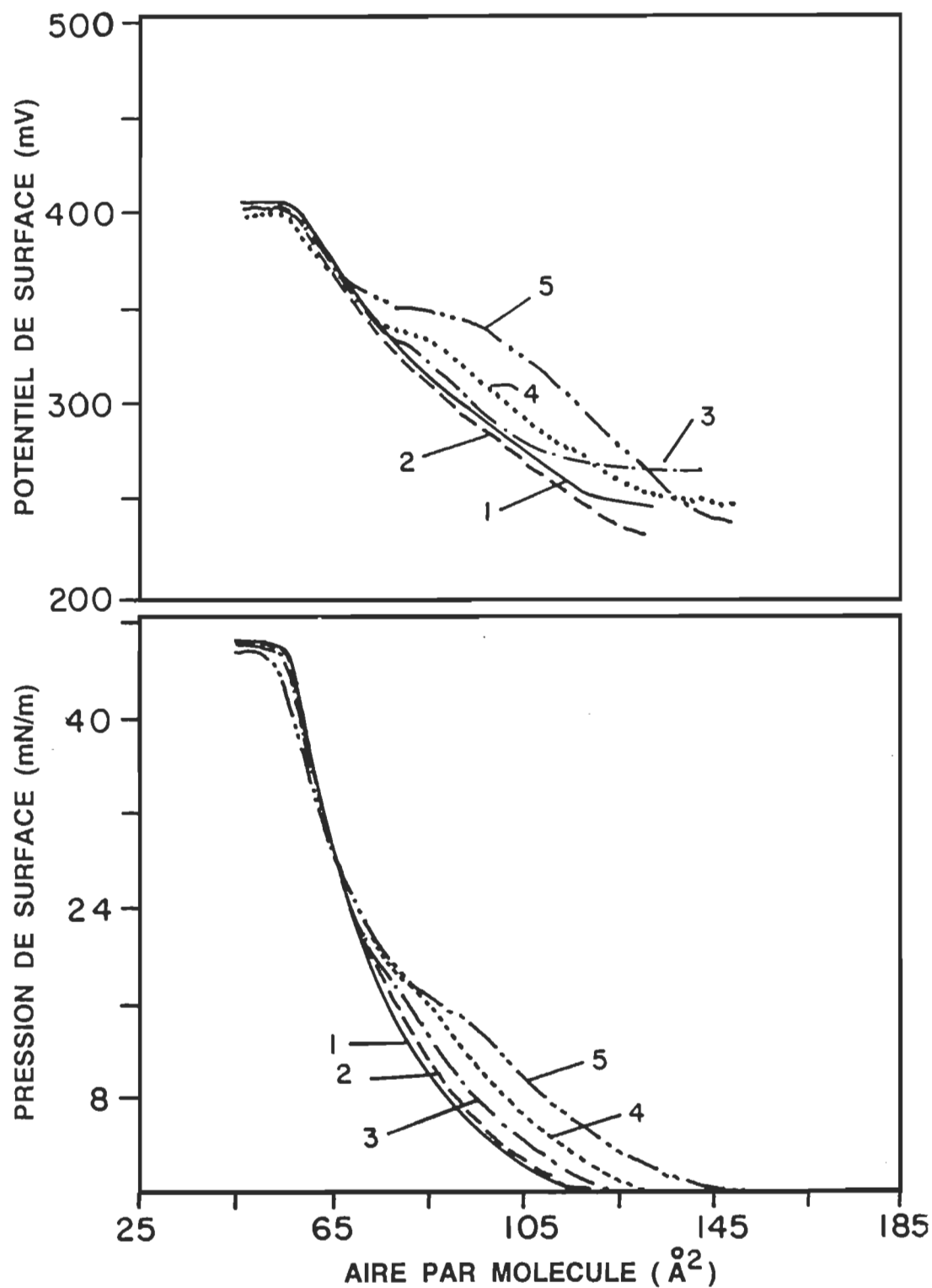


Fig. 22. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPC pure (1) et des mélanges cyt *c* -DOPC. Les fractions molaires de cyt *c* sont de: 0.0072 (2), 0.0104 (3), 0.0203 (4), et 0.034 (5). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

de surface atteint la saturation à une valeur de 405 mV marquant ainsi le plateau de la courbe.

Tableau 4. Comparaison de valeurs déduites des isothermes Π -A de la DOPC entre notre travail et ceux d'autres chercheurs.

Référence	Substrat	Π_c (mN/m)	Aire par molécule (\AA^2)		
			A^c	A^d	A^{30}
1	Tris-HCl, 1 mM, pH = 8.0	46	56	113	67
2	Tris-HCl, 1 mM, pH = 8.0	44.5	56	107	64.5
3	Tris-HCl, 10 mM, pH = 7.4	-	-	113.8	68.3
4	Tampon phosphate 1 mM, pH = 8.0	46.0	56	114	67

A: L'exposant indique la valeur de la pression de surface.

c: Collapse.

d: Aire moléculaire où débute la pression de surface.

1: Notre travail.

2: Lamarche *et al.*, 1988a.

3: Tournois *et al.*, 1989.

4: Tancrède *et al.*, 1981.

3. 2. 3. 1. 2. Isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt *c*-DOPC

Les isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt *c*-DOPC pour différentes fractions molaires du cyt *c* sont représentées dans les figures 22 et 23. Nous avons utilisé deux figures afin de couvrir toutes les compositions étudiées sans masquer les détails importants. Puisque l'aire

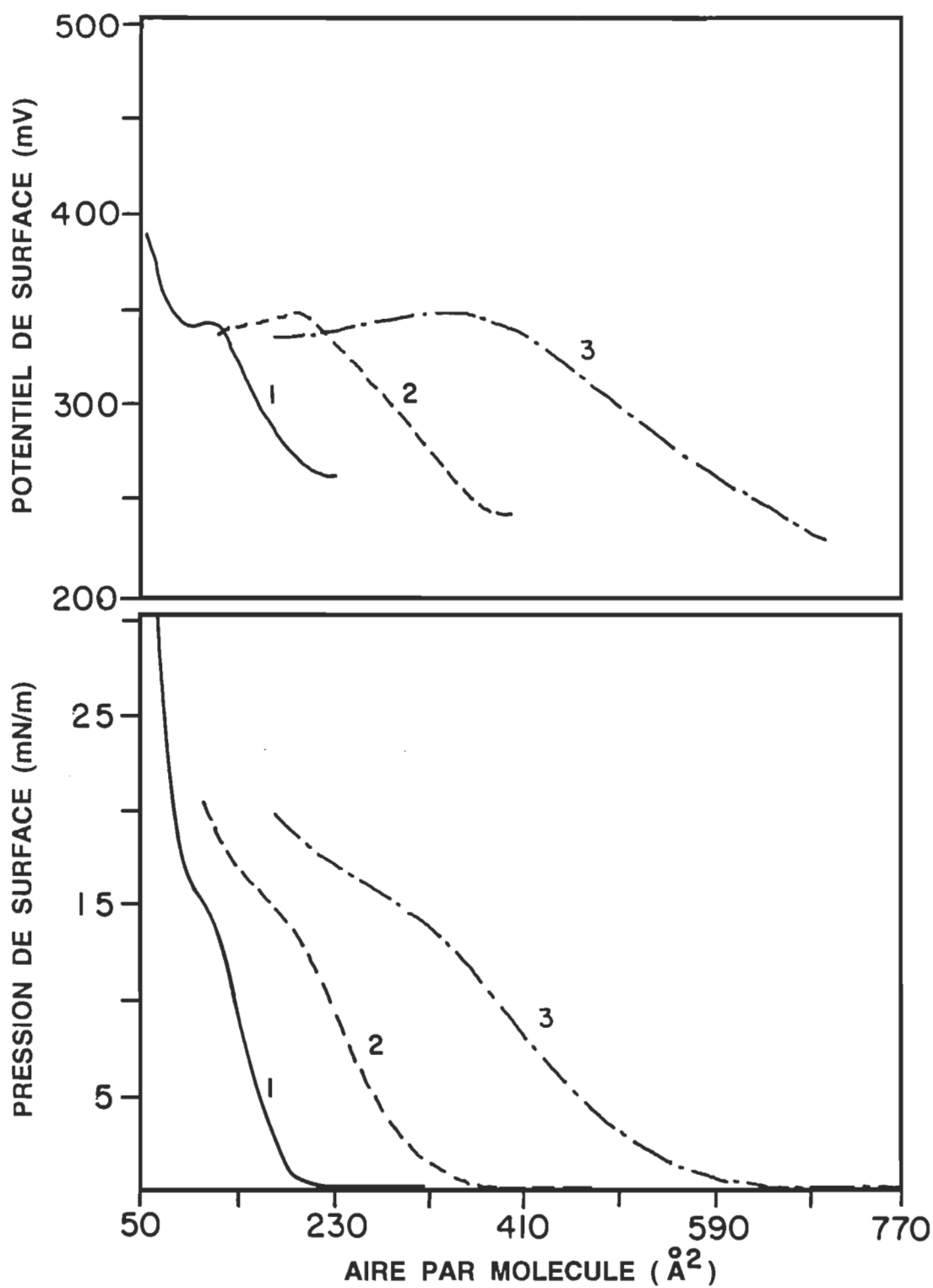


Fig. 23. Isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt *c* -DOPC (suite). Les fractions molaires de cyt *c* sont de: 0.1 (1), 0.24 (2), et 0.487(4). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

moléculaire dans le cas des mélanges varie entre $56 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (valeur au collapse) et plusieurs centaines d' $\text{\AA}^2/\text{molécule}$, nous avons considéré l'erreur expérimentale sur le point dont la pression de surface est une valeur médiane, comprise entre 0 mN/m et la pression au collapse. Ainsi, dans ce cas, cette valeur déterminée en pourcentage permet de donner une estimation plus claire de l'erreur. Dans le cas des mélanges, pour toute la gamme de fractions molaires utilisées, les isothermes moyennes sont obtenues avec une précision de 98 à 99 %. Par ailleurs, l'erreur estimée sur le potentiel de surface est de $\pm 10 \text{ mV}$.

En examinant les isothermes Π -A, on constate qu'elles présentent un seul collapse, celui du lipide, lorsque la fraction molaire de la protéine est très faible. À partir d'une fraction molaire du cyt *c* supérieure à 0.01 (ou 1 %), on note l'apparition d'un second collapse. Un comportement comparable, rarement rapporté dans le cas des mélanges lipide-lipide a été expliqué par l'éjection d'un des constituants de la monocouche (Tancrède *et al.*, 1981; Es-Sounni et Leblanc, 1992). Dans le cas des mélanges lipide-protéine, où la protéine est excessivement représentée en poids et en surface occupée au sein de la monocouche à très basse fraction molaire, ce type d'isotherme devient de plus en plus fréquent à rencontrer. Ainsi, des isothermes Π -A montrant deux collapses, ont été rapportées dans les cas de mélanges où la protéine est incorporée à la monocouche lipidique à partir de la sous-phase (Peschke et Möhwald, 1987; Lamarche *et al.*, 1988a) ou par épandage à partir d'une solution (Taneva *et al.*, 1984; Fidelio *et al.*, 1984; 1987). L'existence de deux collapses dans l'isotherme Π -A d'une monocouche mixte a été souvent interprétée comme témoignant d'une séparation des phases, chaque constituant étant expulsé de la monocouche à la pression correspondant à son collapse (Gaines, 1966; Gabrielli *et al.*,

1981; Fidelio *et al.*, 1987). Comme ceci est le cas dans notre système cyt *c*-DOPC, nous croyons aussi que dans une telle situation les deux constituants peuvent exister en phases séparées lorsque la fraction molaire est supérieure à 1 %. Les deux constituants seraient donc miscibles lorsque la fraction molaire de cyt *c* est inférieure à 1 %, valeur qu'on peut définir comme le seuil de miscibilité du cyt *c* avec la DOPC ou la quantité maximale de molécules protéiques qu'on peut ajouter à la monocouche lipidique avant d'avoir une séparation de phases. Au-dessus de cette fraction molaire critique, un second collapse (Π_{c2}) dont la valeur décroît de 15 à 12.5 mN/m entre les fractions molaires de cyt *c* de 0.020 et 0.034 (Fig. 22 et 23). Au-dessus de la fraction molaire de cyt *c* de 0.034, la valeur du second collapse demeure constante à 12.5 mN/m (Fig. 23). À la fraction molaire de cyt *c* de 0.1, la monocouche est grossièrement influencée par le caractère protéique puisque le poids de la protéine et la surface qu'elle occupe dans le film à 5 mN/m sont respectivement de 40 et 41 %. Ceci montre que, dans une monocouche mixte lipide-protéine, même aux faibles fractions molaires de protéine, la dominance du poids et la surface occupée par la partie protéique peut masquer l'influence de la partie lipidique. Cette hypothèse est à l'encontre de celle avancée par d'autres chercheurs (Fidelio *et al.*, 1986; 1987) qui ont suggéré une meilleure stabilité de la protéine dans la monocouche mixte dont la pression au collapse Π_{c2} est de quelques mN/m supérieure à celle de la protéine pure. Cette explication est de plus en contradiction avec la supposition que l'apparition du second collapse est liée à la séparation de phases.

Les isothermes ΔV -A des mélanges cyt *c*-DOPC sont représentées dans les figures 22 et 23. Celles-ci montrent également deux collapsés ΔV_{c1} et ΔV_{c2} , correspondant aux mêmes aires moléculaires où Π_{c1} et Π_{c2}

sont respectivement observés. La réduction du potentiel de surface au-delà de ΔV_{c2} est une autre preuve de la désorption des molécules protéiques de la monocouche. À partir de l'aire moléculaire où les isothermes Π -A des mélanges s'approchent de celle de la DOPC pure, les isothermes ΔV -A des mélanges tendent aussi à se confondre avec celle du lipide pur. Qualitativement, ces résultats se comparent bien à ceux obtenus avec les mélanges cyt *c*-DOPC, où le cyt *c* est incorporé à la monocouche à partir de la sous-phase (voir Fig. 21). Ce qui montre bien que les propriétés des mélanges cyt *c*-DOPC à l'interface air/eau sont identiques, que la protéine soit ajoutée à la monocouche lipidique par adsorption à partir de la sous-phase ou par épandage à la surface à partir d'une solution.

3. 2. 3. 1. 3. Influence des cycles compression-expansion sur le comportement du mélange cyt *c* -DOPC

La stabilité de la protéine dans la monocouche du mélange est testée par les cycles expansion-compression. Pour ce faire, nous avons soumis le mélange cyt *c*-DOPC dont la fraction molaire de cyt *c* est de 0.03, à une série de cycles compression-décompression. Pour chaque cycle, la barrière mobile est arrêtée à 0 mN/m en décompression et à une pression de surface donnée en recompression. Les résultats illustrés dans la figure 24 montrent que pour les compressions dont la pression d'arrêt est inférieure à Π_{c2} , les isothermes (Π -A et ΔV -A) de recompression se confondent sans hystérèse (Fig. 24, courbe 1). Par contre, lorsque la monocouche est comprimée à une pression de surface supérieure à Π_{c2} , les isothermes Π -A et ΔV -A des recompressions subséquentes se font avec une diminution progressive de l'aire moléculaire (Fig. 24, courbes 2-4). Cette hystérèse observée simultanément sur les isothermes Π -A et ΔV -A est la preuve d'une désorption progressive du cyt *c*, aux pressions de surface plus grandes que

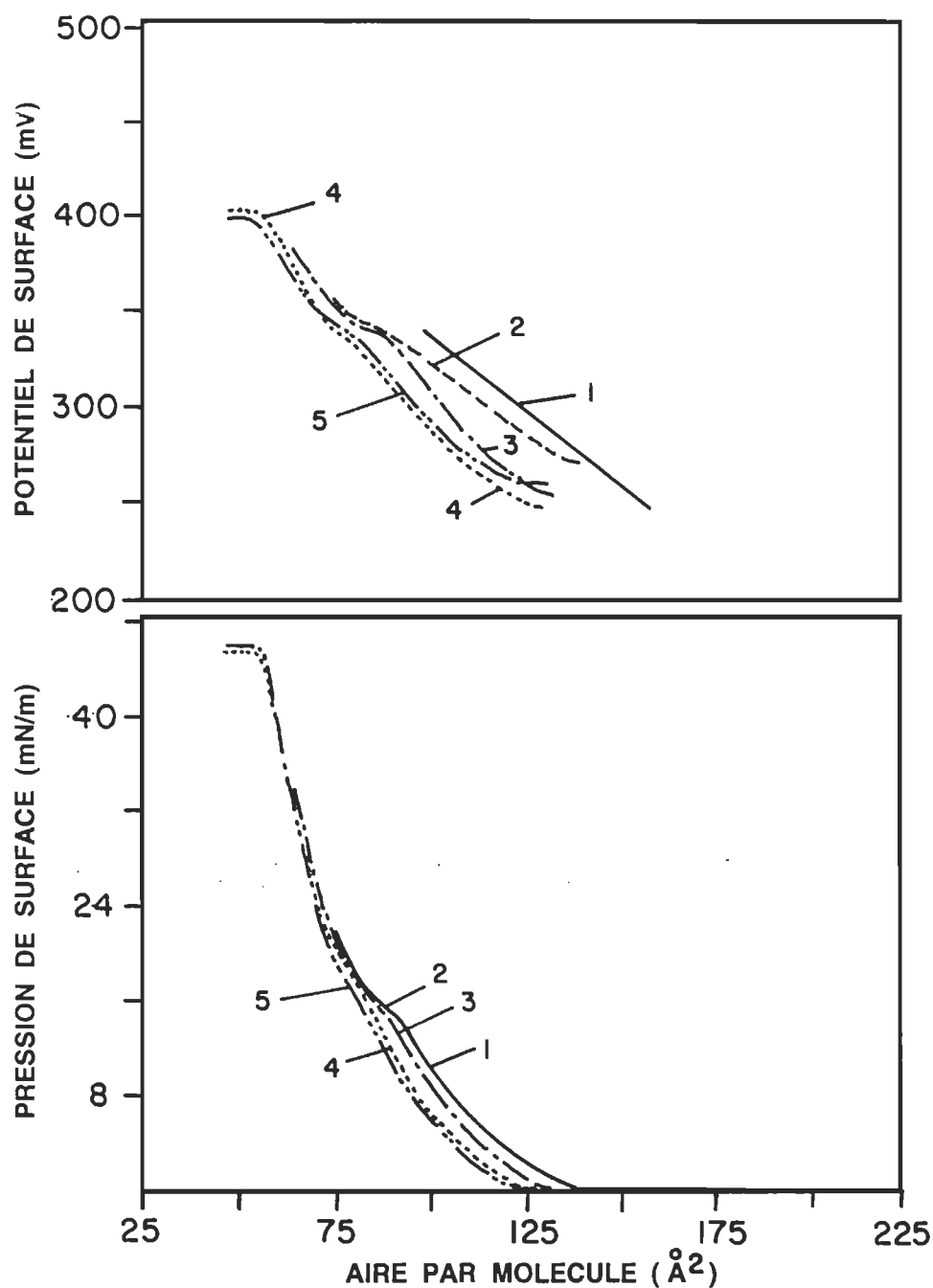


Fig. 24. Effet des cycles compression-expansion sur les isothermes Π -A et ΔV -A du mélange cyt *c* -DOPC ($X_{\text{cyt } c} = 0.034$). Les recompressions sont arrêtées à des pressions de surface inférieures au plateau: à 2.4, 6.2, 10 et 12 mN/m (1), et en haut du plateau: à 22 mN/m (2), 34.8 mN/m (3) et au collapse du lipide (4). La courbe 5 représente le mélange DOPC-cyt *c* ($X_{\text{cyt } c} = 0.01$). Pour la clarté de la figure, toutes les expansions et certaines recompressions ne sont pas représentées. Les autres détails figurent dans le texte. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

Π_{c2} . Après une série de recompressions à une pression de surface de 34.8 mN/m, l'aire moléculaire se stabilise à une valeur constante pour les 4 dernières recompressions (Fig. 24, courbe 4). Dans ce cas où le collapse Π_{c2} est difficilement détectable, la quantité de molécules protéiques demeurant dans le film est apparemment fortement liée aux molécules lipidiques. Celle-ci est évaluée à 1 % (c'est-à-dire une molécule de cyt *c* pour 99 de DOPC) puisque les courbes Π -A et ΔV -A sont presque confondues avec celles du mélange cyt *c*-DOPC ($x_{\text{cyt } c} = 0.01$) issues de la figure 22 et représentées dans la figure 24 (comparer les courbes 4 et 5)

3. 2. 3. 1. 4. Isothermes Π -A des mélanges cyt *f*-DOPC

En mélange avec la DOPC, le cyt *f* montre le même comportement que le cyt *c*, c'est-à-dire avec des isothermes ayant deux collapsés seulement quand la fraction molaire du cyt *f* est supérieure à 0.01 (Fig. 25). Ceci suppose que dans ce cas, le seuil de miscibilité entre les deux constituants est situé à une fraction molaire de cyt *f* de 0.01. Une particularité de l'interaction du cyt *f* avec la DOPC est le fait que pour les fractions molaires de cyt *f* inférieures à 0.01, le décalage entre l'aire moléculaire du mélange par rapport à celle de la DOPC est clairement indicatif d'un lien permanent de la protéine avec les molécules lipidiques à toutes les pressions de surface. Aux fractions molaires supérieures de cyt *f*, les isothermes des mélanges rejoignent celle du lipide seulement aux pressions de surface plus grandes que 32 mN/m. Par ailleurs, si ces courbes étaient tracées en calculant l'aire moléculaire uniquement en fonction du nombre de molécules lipidiques, elles rejoindraient celle de la DOPC seulement à la pression au collapse. Ceci montre que dans le cas du cyt *f*, dû au fait que le collapse est nettement plus haut que celui du cyt *c*, une partie des molécules protéiques demeure dans la monocouche mixte aux pressions de surface supérieures à

Π_{c2} . Le second collapse Π_{c2} pour les quelques fractions molaires de cyt *f* étudiées est nettement supérieur à celui de la protéine pure, soit de 7 à 8 mN/m. En supposant que les mélanges peuvent exister en phases ou sous

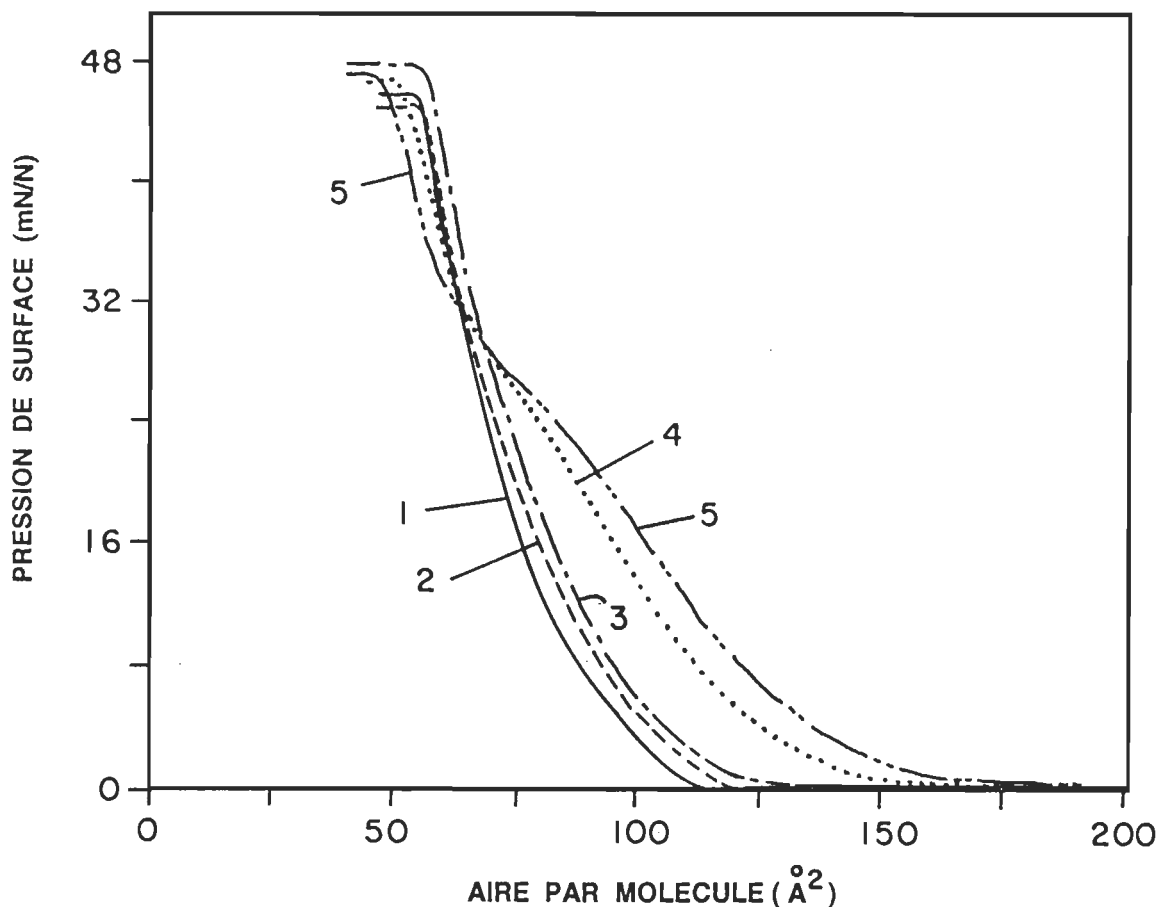


Fig. 25. Isothermes Π -A de la DOPC pure (1) et des mélanges cyt *f*-DOPC aux fractions molaires suivantes de cyt *f*: 0.007 (2), 0.011 (3), 0.034 (4), et 0.05 (5). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

forme de domaines séparés au-dessus du seuil de miscibilité, nous n'avons pas pris de mesures pour d'autres mélanges. Ainsi, comme nous l'avons obtenu pour les mélanges cyt *c*-DOPC, la tendance à la diminution de Π_{c2} de 26 à 24 mN/m pour les fractions molaires respectives de 0.034 et 0.050, pourrait indiquer que les mélanges finiraient par atteindre une valeur égale ou proche de celle du collapse de la protéine pure à partir d'une fraction molaire de cyt *f* qui procurerait à la monocouche un caractère protéique.

3. 2. 3. 1. 5. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DSPC

L'isotherme Π -A de la DSPC est représentée dans la figure 26. À cause de la saturation de ses chaînes d'acide gras, la DSPC donne à l'interface air/eau par une monocouche de type gel, très peu compressible. La courbe considérée pour cette étude est la moyenne de 12 expériences faites à partir de 4 échantillons pesés à partir de 2 lots différents. À 30 mN/m, l'écart maximal entre les courbes moyennes est de $1 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ ce qui correspond à une erreur expérimentale approximative sur l'aire moléculaire de $\pm 1 \%$. La pression de départ est détectée à une aire moléculaire approximative de $62 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Les valeurs au collapse sont de 58.7 mN/m et $43 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour la pression de surface et l'aire moléculaire respectivement. Ces valeurs ainsi que d'autres tirées de l'isotherme Π -A se comparent bien à celles d'autres chercheurs (tableau 5). La légère différence observée sur l'aire de départ pourrait être due à l'utilisation de différentes sous-phases dans les trois cas. Par exemple, utilisant un tampon Tris ou phosphate, d'autres chercheurs ont constaté l'influence des ions Tris sur la disparition de la transition de phase observée dans le cas de l'isotherme Π -A de la dimyristoylphosphatidylsérine mesurée sur un tampon phosphate (Demel *et al.*, 1987). Dans le cas du collapse, nous ne pouvons comparer nos valeurs à celles des autres chercheurs mentionnés, car pour des raisons inconnues, la compression des isothermes Π -A obtenues par Ducharme (1987) et par Phillips *et al.* (1970) est arrêtée avant d'atteindre le collapse.

L'isotherme ΔV -A de la DSPC illustrée dans la figure 26 montre une augmentation croissante du potentiel de surface entre 520 et 575 mV, valeurs correspondant aux aires de début de pression de surface et du collapse respectivement. Cette isotherme est obtenue avec une erreur

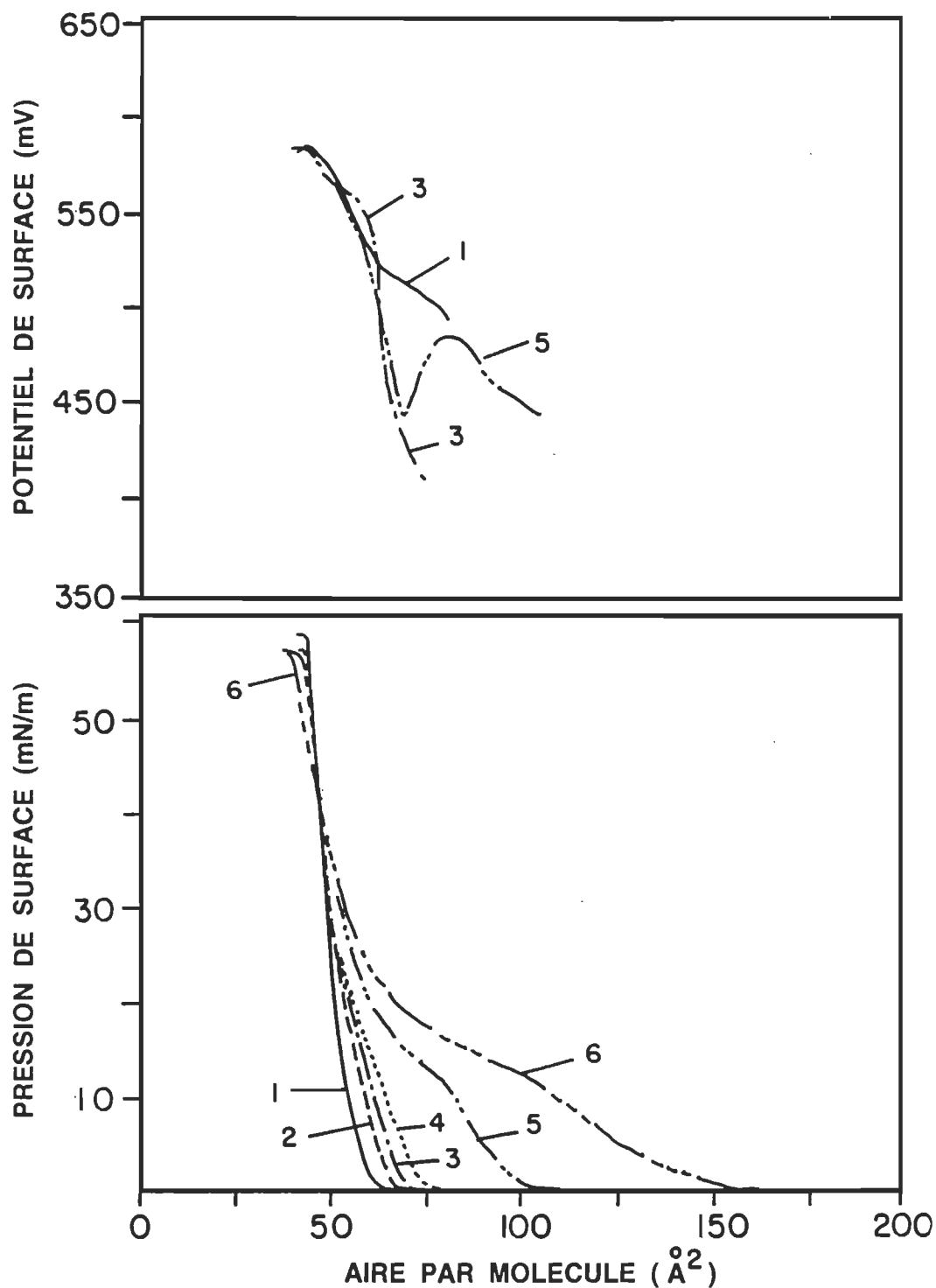


Fig. 26. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DSPC pure (1) et des mélanges cyt *c*-DSPC aux fractions molaires suivantes de cyt *c*: 0.005 (2), 0.010 (3), 0.014 (4), 0.041 (5) et 0.096 (6). Pour la clarté de la figure, seules quelques isothermes ΔV -A sont représentées. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

de ± 10 mV.

Tableau 5. Comparaison de valeurs déduites des isothermes Π -A de la DSPC entre notre travail et ceux d'autres chercheurs.

Référence	Substrat	Π_c (mN/m)	Aire par molécule (\AA^2)		
			A^c	A^d	A^{30}
1	Tris-HCl, 1 mM, pH = 8	58.7	43	62	48
2	Phosphate, 1 mM, pH = 7.2	-	-	56	45.5
3	NaCl, 0.1 M	-	-	58	46.5

A: L'exposant indique la valeur de la pression de surface.

c: Collapse.

d: Aire où débute la pression de surface.

1: Notre travail.

2: Ducharme, 1987.

3: Phillips *et al.*, 1970.

3. 2. 3. 1. 6. Isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt *c*-DSPC

Les isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt *c*-DSPC pour les fractions molaires de cyt *c* comprises entre 0 et 0.1 sont représentées dans la figure 26. Le comportement observé dans le cas des mélanges de ces deux constituants est similaire à celui du système cyt *c*-DOPC discuté ci-dessus. Même à la plus basse fraction molaire de cyt *c* utilisée, soit 0.005, le deuxième collapse à peine détectable peut être rendu évident si l'isotherme est tracée avec une échelle d'aire moléculaire plus élargie que celle de la figure 26. Ceci suppose qu'en présence de la DSPC, le cyt *c* est miscible à

une fraction molaire à peine inférieure à 0.005. Aux fractions molaires supérieures, le deuxième collapse qui devient plus évident décroît de 14.2 à 10.6 mN/m pour les fractions molaires comprises entre 0.01 et 0.10. Cette faible valeur de Π_{c2} est proche de celle du cyt *c* pure. Étant donné que nous supposons une séparation de phases lorsque la fraction molaire de la protéine dépasse un seuil critique, nous avons jugé inutile d'étudier d'autres mélanges au-delà de la fraction molaire de cyt *c* de 0.1. Aux pressions supérieures à 36 mN/m, les courbes des mélanges croisent l'isotherme Π -A de la DSPC pure indiquant l'éventuelle éjection de toutes les molécules de cyt *c* de la monocouche. En comparant les deux systèmes, cyt *c*-DOPC et cyt *c*-DSPC, nous pouvons constater que le cyt *c* se partitionne mieux dans la monocouche fluide de DOPC que dans la monocouche solide formée par la DSPC. Le fait que le seuil de miscibilité est plus faible dans le dernier cas, suggère que le partitionnement de la protéine dans la monocouche lipidique est possible mais plus restreint lorsque les chaînes saturées d'acide gras forment un état solide. Des résultats similaires ont été rapportés pour des systèmes lipide-protéine impliquant l'adsorption de la protéine à une monocouche lipidique comprimée à une certaine pression de surface (Morse II et Deamer, 1973; Heckl *et al.*, 1985b; Pilon *et al.*, 1987; Peschke et Möhwald, 1987; Lamarche *et al.*, 1988a). Dans ces cas aussi, ces travaux ont démontré l'importance de la fluidité de la monocouche pour l'acquisition d'une grande pénétration des molécules protéiques de la sous-phase dans la partie interfaciale.

L'existence du deuxième collapse est également rendue évidente dans les isothermes ΔV -A des mélanges dont la fraction molaire de cyt *c* est supérieure à 0.005. Au fur et à mesure que l'aire moléculaire est réduite en bas de l'aire correspondant à Π_{c2} , le potentiel de surface reste constant ou

chute à cause de la diminution de la contribution des molécules de *cyt c* sous la surface de l'électrode. À plus faible aire moléculaire, les isothermes ΔV -A des mélanges rejoignent celle du lipide pur comme observé dans le cas de la pression de surface.

3. 2. 3. 1. 7. Application de la règle d'additivité aux mélanges *cyt-PC*

La règle d'additivité de l'aire moléculaire et du potentiel de surface est exprimée par les équations 1 et 8 respectivement. L'évaluation de l'énergie libre en excès du mélange est déterminée par l'équation 2. L'application de la règle d'additivité de l'aire moléculaire aux monocouches mixtes permet (rappelons le) d'évaluer la miscibilité et l'interaction entre les deux constituants à l'interface air/eau (Gaines, 1966; Birdi, 1989). Selon Gaines (1966), toute déviation par rapport à cette règle est la preuve de l'existence d'une interaction entre les molécules des deux constituants.

Pour les phosphatidylcholines insaturée (DOPC) et saturée (DSPC), les résultats déduits graphiquement des isothermes des constituants purs et en mélanges (Fig. 22, 23 et 26) sont représentés dans les figures 27 et 28 respectivement. Dans les deux cas, l'application de la règle d'additivité permet de statuer pour des mélanges idéaux. Rappelons qu'un mélange idéal peut signifier l'absence d'interaction entre les constituants, mais avec la possibilité d'une immiscibilité aussi bien que d'une miscibilité dans le film. Cette dernière peut être confirmée par l'application de la règle des phases en deux dimensions ou par l'évaluation de l'énergie libre en excès du mélange au cas où il existe une certaine interaction entre les molécules.

Dans le cas des mélanges *cyt f*-DOPC, les points expérimentaux sont conformes à la règle d'additivité seulement pour les fractions molaires de *cyt f* inférieures à 0.02. Aux fractions molaires supérieures, les points

expérimentaux sont décalés positivement par rapport aux mélanges idéaux (Fig. 29). Une déviation positive par rapport à la règle d'additivité n'est pas chose fréquente dans les travaux publiés antérieurement dans ce domaine. Dans les rares cas où elle est rapportée pour les mélanges lipide-lipide, certains chercheurs l'attribuent à une incompatibilité ou une séparation de

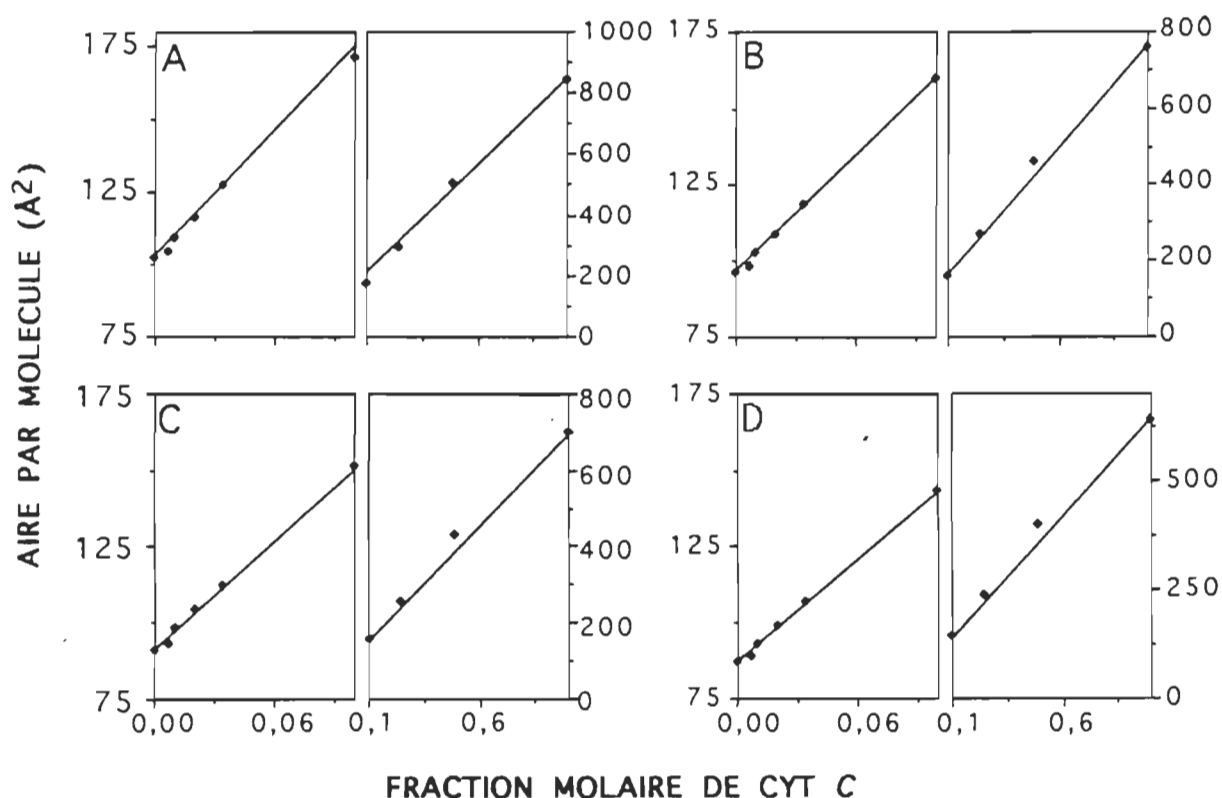


Fig. 27. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système *cyt c* -DOPC. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir des figures 22 et 23, aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées par la règle d'additivité (équation 1) et les valeurs expérimentales.

phases à petite ou grande échelle entre les deux constituants (N'soukpoé-Kossi *et al.*, 1988; Grainger *et al.*, 1990). Dans les cas de mélanges lipide-protéine, le décalage positif par rapport au mélange idéal a été expliqué par

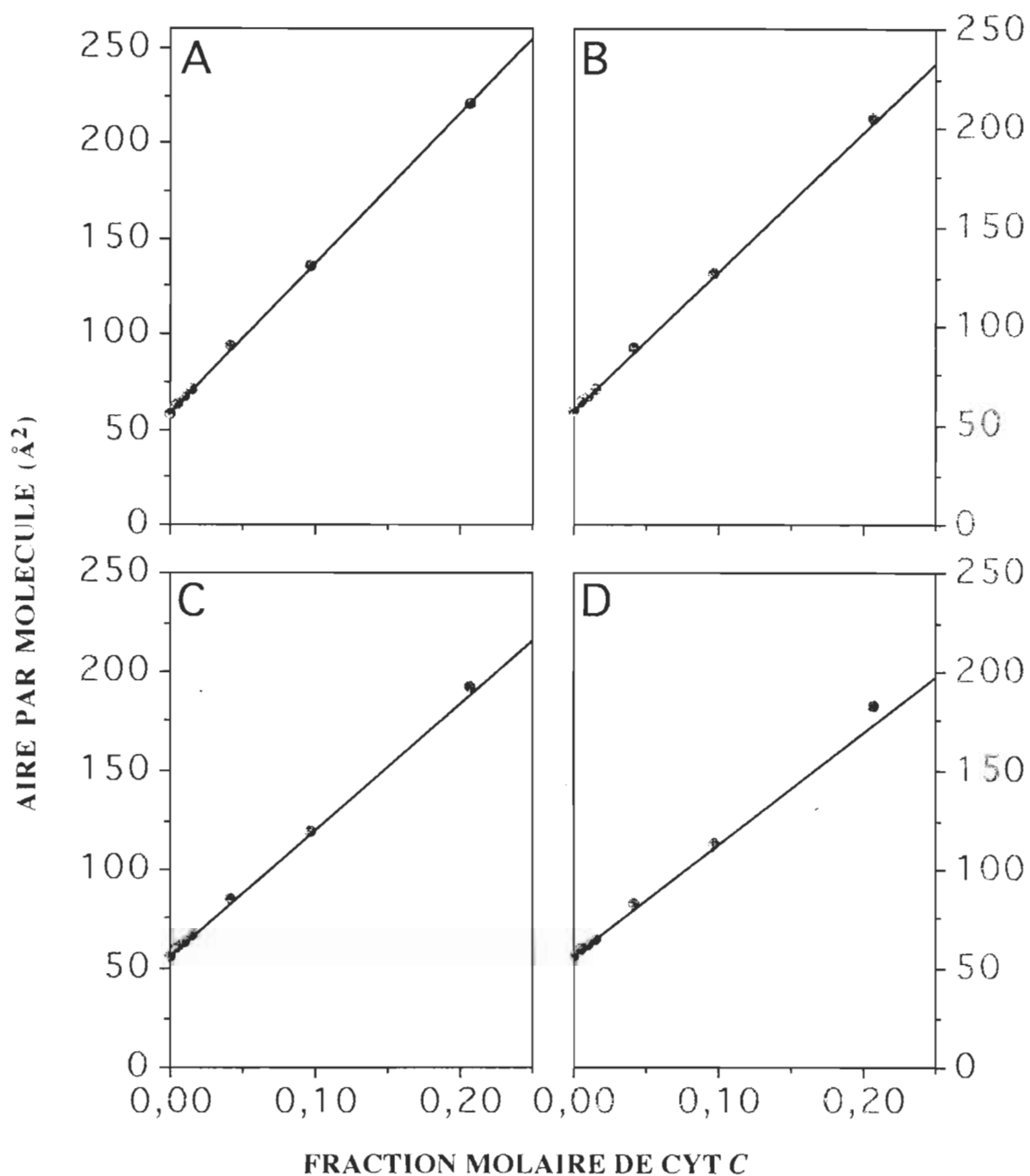


Fig. 28. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt *c* -DSPC. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 26 aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales.

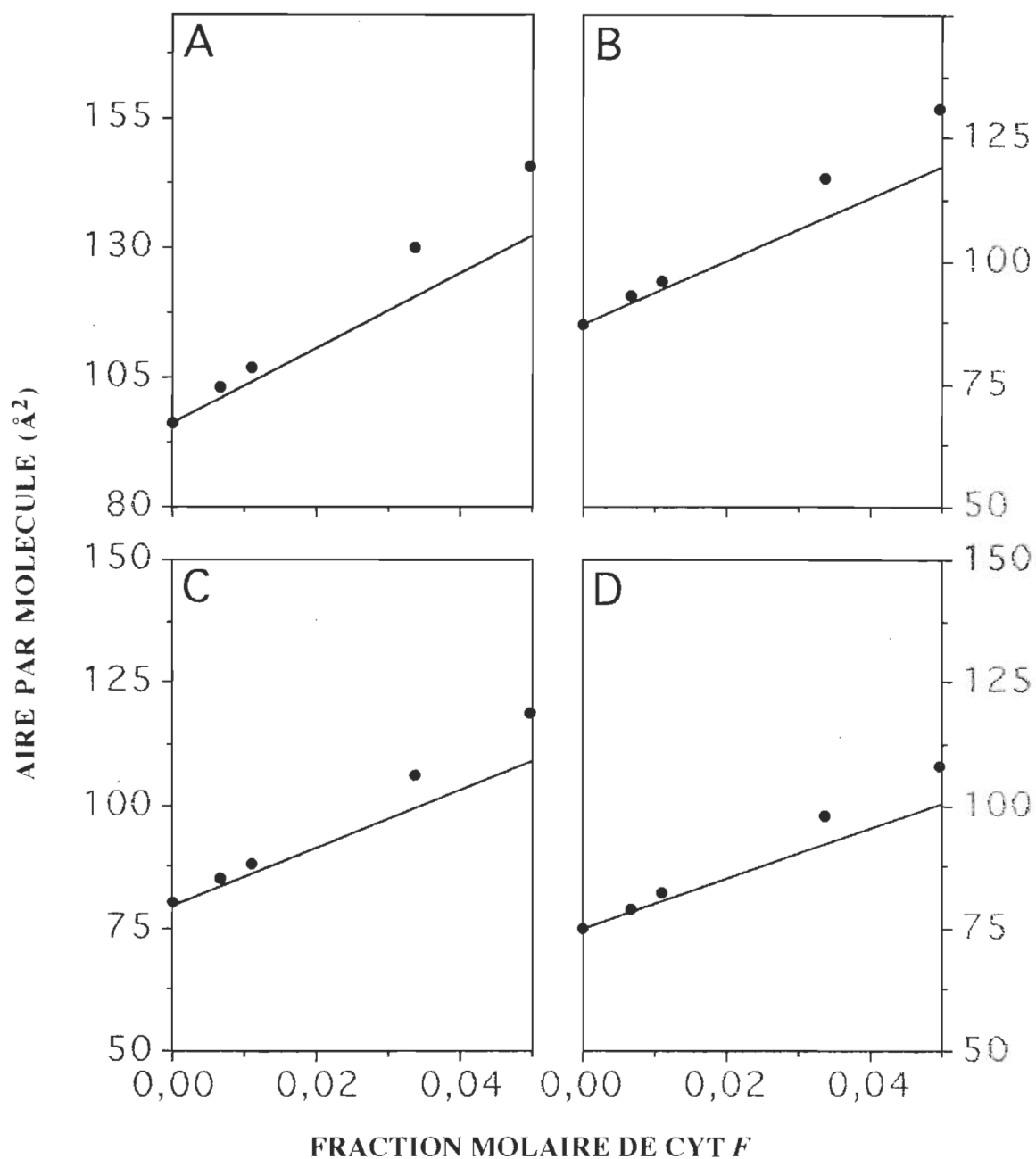


Fig. 29. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt *f*-DOPC. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 25 aux pressions de surface de: 5 mN/m (A), 9 mN/m (B), 13 mN/m (C) et 17 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales.

une plus faible stabilité thermodynamique entre les constituants (Birdi, 1989; Maget-Dana *et al.*, 1989). Dans le cas des mélanges *cyt f*-DOPC, pour les fractions molaires de *cyt f* supérieures à 0.02, le décalage positif observé dans la figure 29 appuie l'hypothèse de la séparation de phases et/ou l'éventuel changement conformationnel de la protéine suite à cette ségrégation des phases. Nous reviendrons à ce sujet plus bas, au paragraphe 3.2.3.3.2.1.

Les résultats concernant la règle d'additivité du potentiel de surface (équation 8) pour les mélanges *cyt c*-DOPC sont représentés dans la figure 30. Compte tenu de l'erreur expérimentale enregistrée sur les isothermes ΔV -A et qui est de ± 10 mV, nous considérons que ceux-ci sont conformes à la règle d'additivité. Contrairement à la règle d'additivité de l'aire moléculaire, expression souvent exploitée dans les publications dans ce domaine, celle du potentiel de surface est rarement rencontrée. En effet, même les isothermes ΔV -A des constituants purs sont rarement publiées et ce, probablement à cause de la diversité des modèles qui simulent le potentiel de surface de la monocouche (Taylor *et al.*, 1990) rendant ainsi leur interprétation quantitative hasardeuse (Möhwald, 1990). Parmi les rares cas rapportés pour la règle d'additivité du potentiel de surface des mélanges lipide-lipide, parfois même sans aucune mention d'interprétation, la conformité à la règle d'additivité est expliquée par l'absence d'interaction entre les molécules, tandis que le décalage des points expérimentaux par rapport à cette règle est interprétée par l'existence d'une interaction entre les deux types de molécules (Shah et Schulman, 1967; Magio *et al.*, 1977). Si nous appliquons cette interprétation à nos mélanges *cyt c*-DOPC (Fig. 30), nous pouvons également supposer par la conformité des points expérimentaux avec les points prévus par la règle d'additivité, une absence

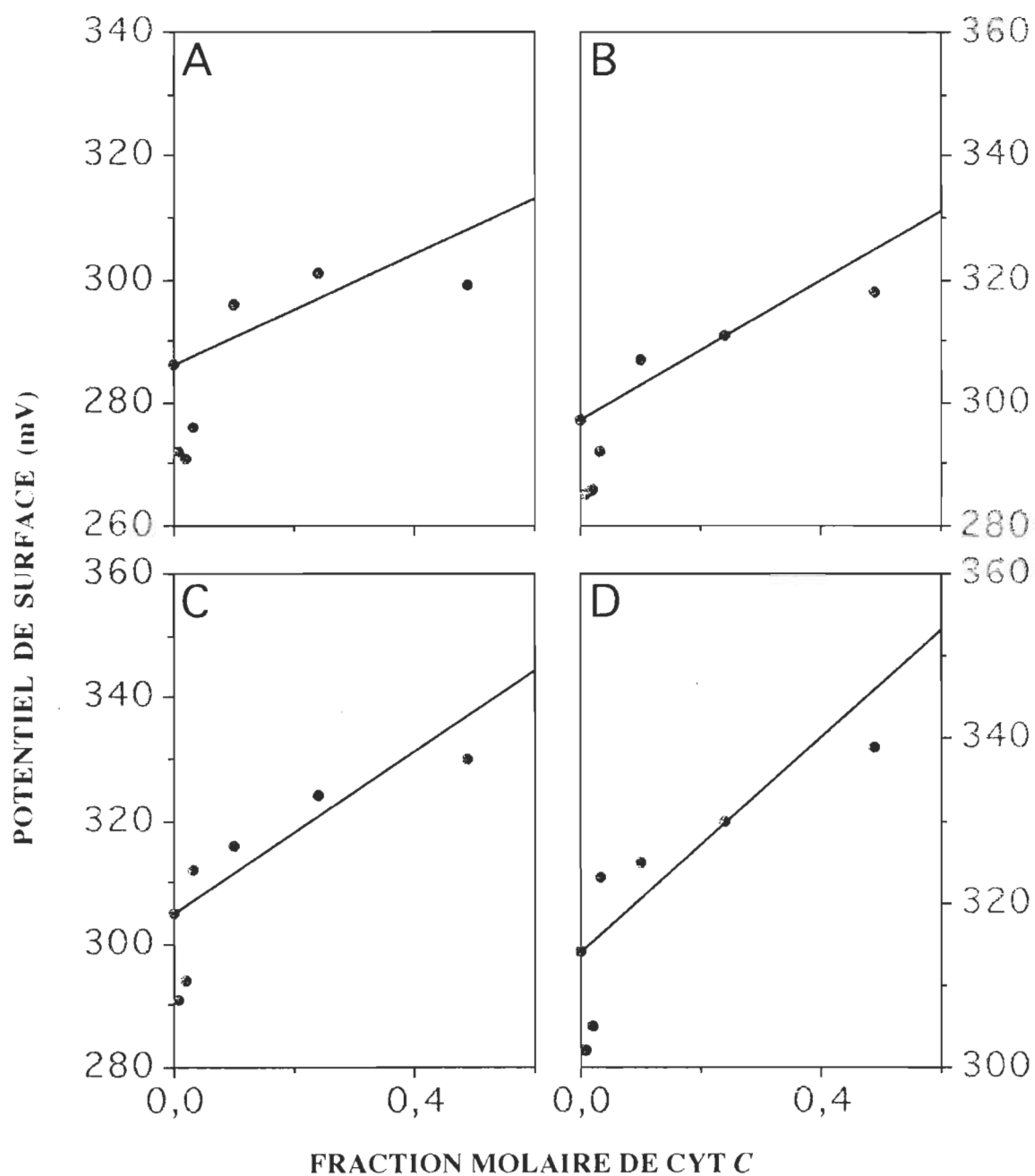


Fig. 30. Potentiel de surface représenté en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système *cyt c*-DOPC. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir des figures 22 et 23, aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 6)- et les valeurs expérimentales.

d'interaction entre les dipôles du *cyt c* et de la DOPC. Cette hypothèse vient appuyer l'absence d'interaction montré ci-dessus par la règle d'additivité de l'aire moléculaire. Dans les cas des systèmes *cyt f*-DOPC et *cyt c*-DSPC, les résultats représentés dans les figures 31 et 32 montrent un décalage négatif des points expérimentaux par rapport aux mélanges idéaux. Ce décalage très prononcé dans le cas du système *cyt c*-DSPC où les différences atteignent pour certains points des valeurs de plus de 150 mV peut être dû à une incompatibilité entre les deux constituants. Particulièrement dans le cas des mélanges *cyt c*-DSPC, la séparation de phases survenue à une fraction molaire de *cyt c* très faible, pourrait avoir un effet sur l'orientation du moment dipolaire du lipide.

3.2.3.2. Etude de l'interaction du *cyt c* avec la phosphatidylsérine: influence du groupe polaire chargé

L'importance de l'interaction électrostatique dans les systèmes lipide-protéine a été soulignée par plusieurs travaux antérieures (voir chap. 1). Plusieurs fonctions physiologiques sont sans doute liées à la charge électrique négative que porte le feuillet interne d'une membrane cellulaire. Le choix de la DOPS pour cette étude peut être justifié par le fait que ce lipide qui donne une monocouche liquide expansée, a un comportement comparable à celui de la phosphatidylsérine extraite des cellules animales et dont on a montré qu'elle forme le constituant principal de la partie interne de la membrane plasmique de l'erythrocyte (Gennis, 1989).

Avant d'aborder le cas des mélanges *cyt c*-DOPS, nous aimerions faire remarquer qu'à pH = 8, les isothermes Π -A et ΔV -A du *cyt c* pur obtenues sur une sous-phase enrichie en CaCl_2 (résultat non montré), ne diffèrent guère de celle obtenue (Fig. 14) sur le tampon Tris.

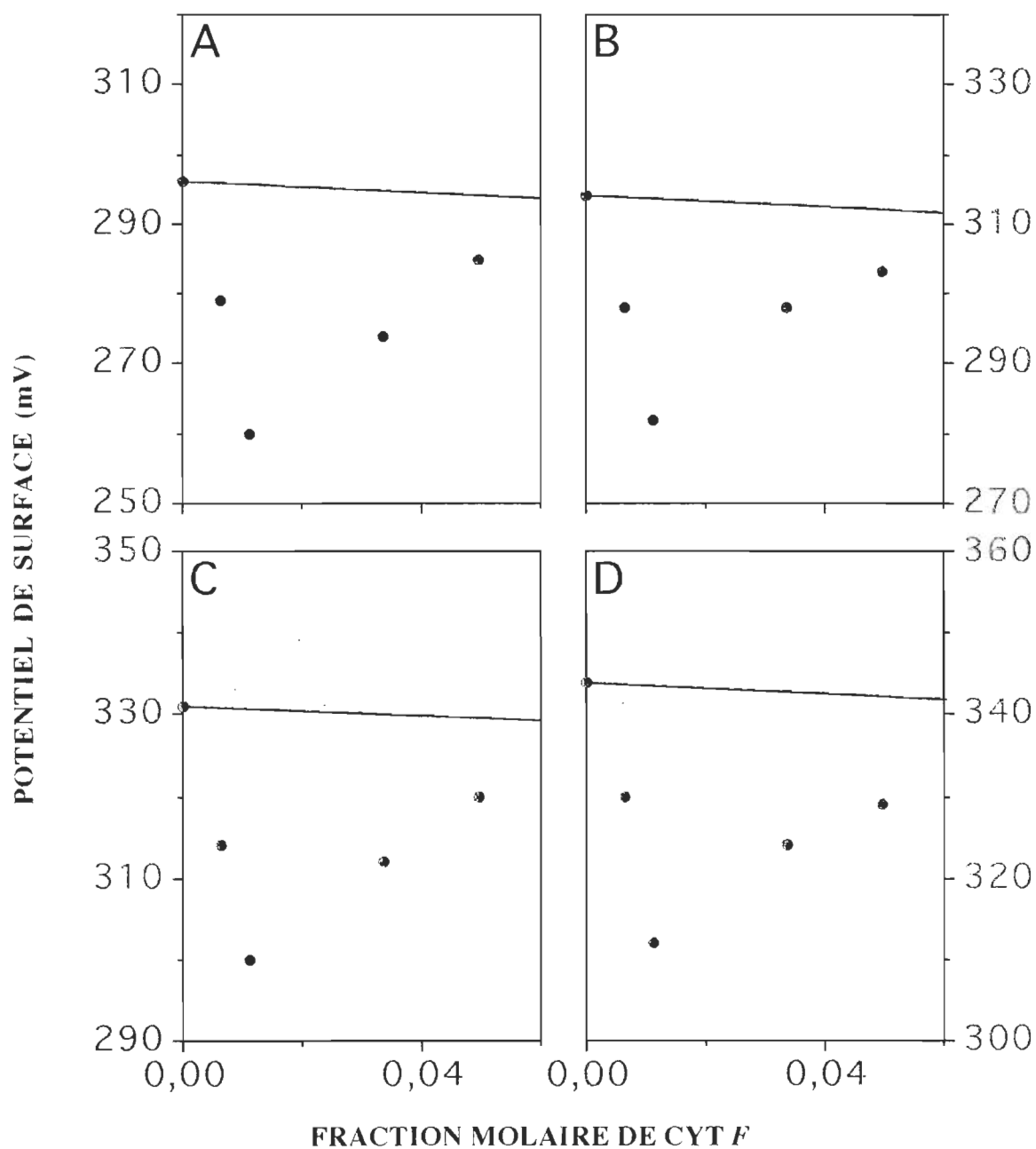


Fig. 31. Potentiel de surface représenté en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système *cyt f*-DOPC. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 25 aux pressions de surface de: 5 mN/m (A), 9 mN/m (B), 13 mN/m (C) et 17 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 6)- et les valeurs expérimentales.

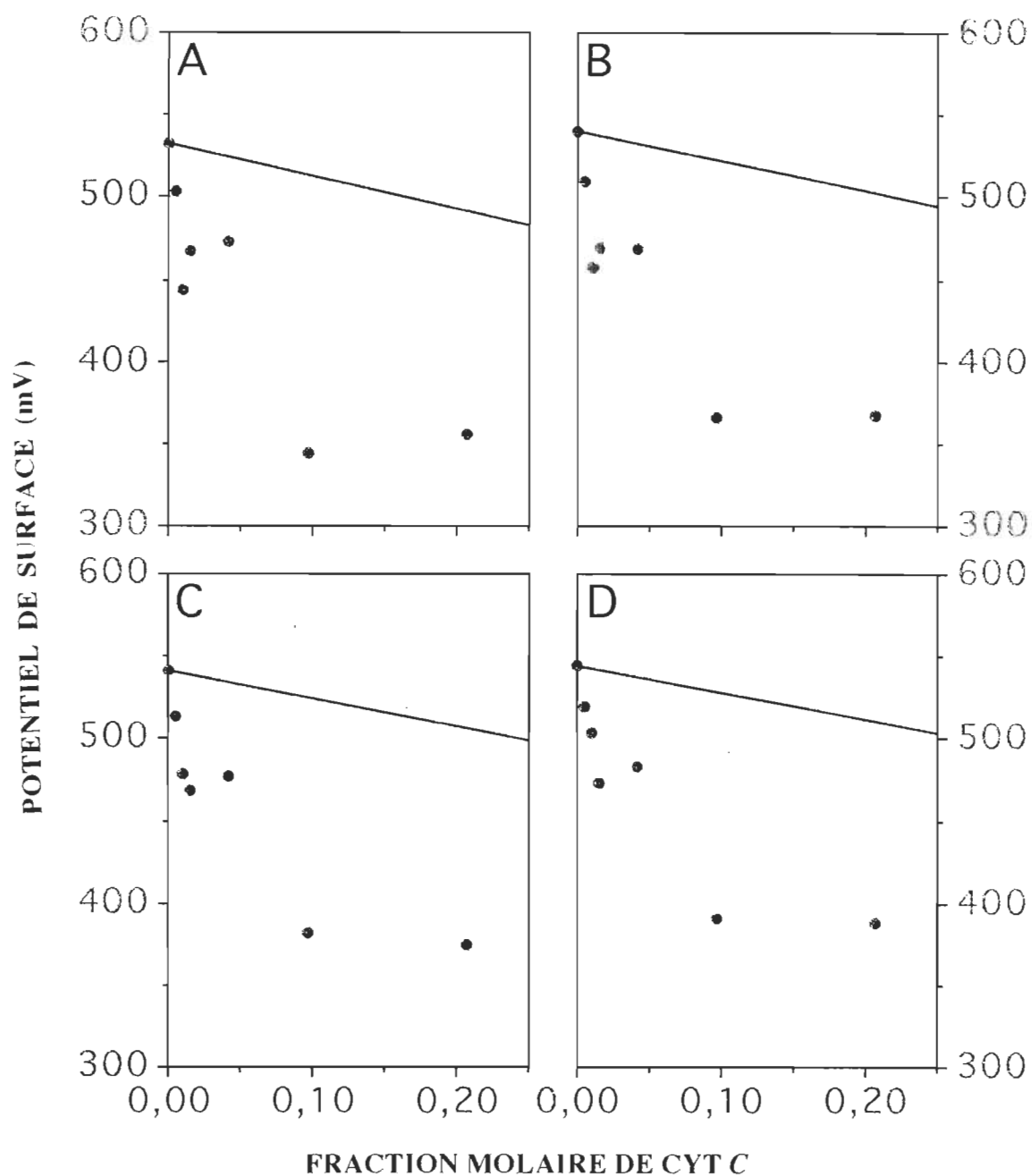


Fig. 32. Potentiel de surface représenté en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt c-DSPC. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 26 aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 6)- et les valeurs expérimentales.

Répendue sur un tampon Tris-HCl millimolaire, à pH = 8, la DOPS porte sur sa tête polaire une charge nette négative. Par contre, si le pH de la sous-phase est réduit par exemple à 4, ou bien si la sous-phase est enrichie d'ions calcium, la DOPS perd sa charge négative et devient neutre (Gregory et Ginsberg, 1984). À des fins de simplification dans le texte, dans les deux cas, nous référerons à ces états par les termes "chargée" et "neutre".

Les isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS en absence et en présence d'ions calcium dans la sous-phase sont représentées dans la figure 33. À l'état chargé, la monocouche de la DOPS est caractérisée par un début de pression de surface à approximativement $125 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ et une pression et une aire au collapse de $47.0 \pm 0.5 \text{ mN/m}$ et $58 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ respectivement (tableau 6). Les courbes représentées sont la moyenne de 12 expériences faites à partir de 4 pesées successives. L'écart maximum entre les courbes moyennes est de $3 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour l'aire moléculaire, et de 10 mV pour le potentiel de surface. Parallèlement à l'augmentation de la pression de surface entre les aires mentionnées ci-dessus, l'isotherme ΔV -A donne une croissance continue de potentiel de surface allant de 73 à 213 mV. Sachant que l'enrichissement de la sous-phase par des ions calcium ou son acidification donne le même effet sur la monocouche de phosphatidylsérine (Demel *et al.*, 1987), nous avons opté pour l'utilisation de ces ions plutôt que l'acide chlorhydrique dont une quantité substantielle est nécessaire pour l'obtention du pH désiré. Un autre argument en faveur du choix du calcium est, qu'à pH acide, les propriétés interfaciales de la protéine sont nettement modifiées suite à sa dénaturation (Demel *et al.*, 1991). L'utilisation de traces de CaCl_2 éviterait ainsi la contamination de la sous-phase. Les isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS neutre répandue sur un tampon Tris-HCl (10^{-3} M , pH = 8) enrichie en CaCl_2 à différentes

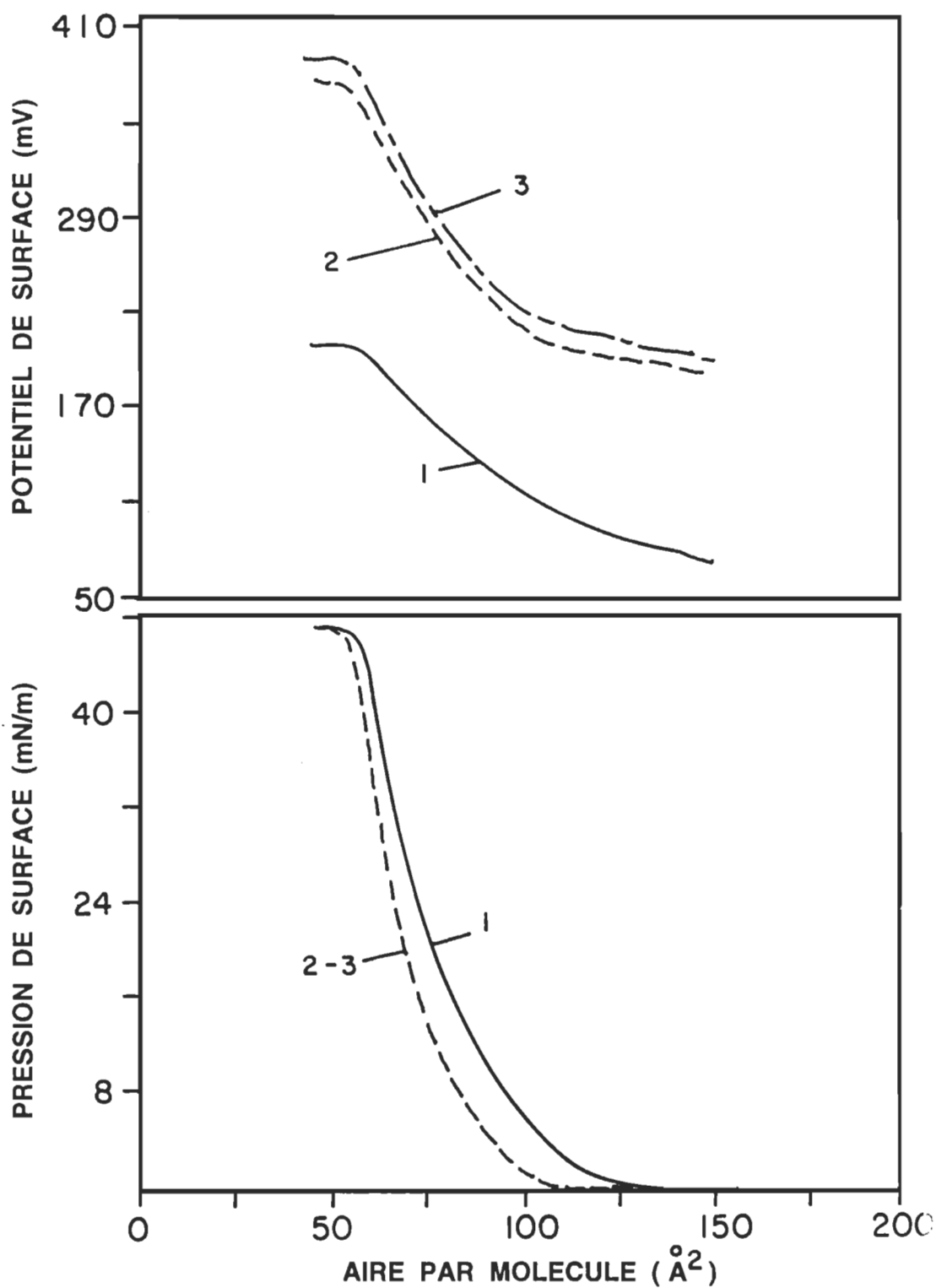


Fig. 33. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS pure. La sous-phase (Tris-HCl 1 mM, pH: 8) contient un supplément de CaCl_2 aux concentrations de 0 mM (courbe 1), 1 mM (courbe 2) et 10 mM (courbe 3).

concentrations sont illustrées dans la figure 33. Dans le cas où la sous-phase contient 2 mM de CaCl_2 , les isothermes Π -A et ΔV -A (non montrées)

Tableau 6. Comparaison des valeurs déduites des isothermes Π -A de la DOPS entre notre travail et ceux d'autres chercheurs.

Référence	Substrat	Π_c (mN/m)	Aire par molécule (\AA^2)			
			A^c	A^d	A^{30}	A^{40}
1	Tris-HCl, 1 mM pH = 8	47	58	125	68.5	62.5
2	Tris-HCl, 5 mM pH = 7.4	46	58.5	125	67.5	61.5
3	Tris-HCl, 5mM pH = 7.4, + 10 mM CaCl_2	-	-	-	62.5	-
1	Tris-HCl, 1 mM pH = 8, + 1 mM CaCl_2	46.5	55	108	62.8	58.2
2	Tris-HCl, 5 mM pH = 7.4, + 10 mM CaCl_2	44	57.4	108	62.5	57.4

A: L'exposant indique la valeur de la pression de surface.

c: Collapse.

d: Aire où débute la pression de surface.

1: Notre travail.

2: Mattai *et al.*, 1989.

3: Demel *et al.*, 1987.

sont respectivement confondues avec celles où la sous-phase contient 1 et

10 mM de CaCl_2 . Afin d'établir les courbes moyennes de la DOPS neutre, 4 à 6 expériences sont effectuées dans chaque cas. Pour vérifier l'effet maximal que peut causer l'ajout de calcium dans la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS, nous avons utilisé trois concentrations, soit 1, 2, et 10 millimolaire. Les résultats ont montré qu'en présence de calcium dans la sous-phase, les isothermes sont déplacées vers les plus petites aires moléculaires. En outre, l'isotherme ΔV -A est affectée à tous ses points par une élévation du potentiel de surface. Comparés aux travaux d'autres chercheurs (tableau 6), les isothermes Π -A de la DOPS déterminées sur un substrat avec ou sans calcium, donnent des aires moléculaires et des pressions de surface au collapse similaires. Par ailleurs, utilisant une sous-phase acide contenant de l'acétate de sodium à $\text{pH} = 4$, Demel *et al.* (1987), ont constaté que l'isotherme Π -A obtenue dans ces conditions est identique à celle mesurée sur un tampon Tris-HCl additionné de 10 mM de CaCl_2 .

L'augmentation du potentiel de surface observée dans la figure 33 est due à la présence des ions calcium dans la sous-phase. Dans le cas d'une monocouche chargée, le potentiel de surface est défini par l'expression suivante (Gaines, 1966):

$$\Delta V = 4 \Pi n \mu_{\perp} + \psi \quad (10)$$

où ΔV est le potentiel de surface, μ_{\perp} le moment dipolaire pour la monocouche non chargée et ψ représente la différence de potentiel supplémentaire due à la double couche entre la surface et la sous-phase. Cette double couche est constituée par les charges des molécules de la monocouche et les contre-ions de la sous-phase.

L'utilisation des différentes concentrations d'ions calcium dans la sous-

phase a montré que l'effet de ces ions sur la condensation de la monocouche observée au niveau de l'isotherme Π -A est maximal et constant indépendamment de la concentration utilisée. Dans le cas du potentiel de surface, l'accroissement de 165 mV au collapse est constant pour les concentrations de 1 et 2 mM de CaCl_2 et légèrement plus élevé (16 mV de plus au collapse) pour 10 mM de CaCl_2 . Ces observations permettent de conclure que la présence des ions calcium dans la sous-phase, à une concentration de 1 mM, est suffisante pour condenser la monocouche de DOPS à son maximum. Donc, c'est cette concentration qui sera utilisée dans toutes les expériences ci-dessous impliquant les ions calcium. D'ailleurs, dans une étude antérieure, Gregory et Ginsberg (1984) ont montré par la technique de radiocomptage, utilisant du calcium radioactif, qu'une concentration de 10^{-4} M de chlorure de calcium dans la sous-phase est suffisante pour donner un rapport interfacial Ca^{++}/PS de 1:2. À cette concentration, ces chercheurs ont appuyé l'hypothèse déjà suggérée par d'autres que chaque ion Ca^{++} est associé à deux molécules de PS neutralisant ainsi leur charge. Dans le cas du modèle des liposomes à base de PS et de protéine "4.1" un constituant essentiel de la membrane de l'érythrocyte, Shiffer *et al.* (1988) ont montré que le calcium réduit l'interaction électrostatique entre les molécules des deux constituants. Ce modèle peut également s'appliquer à notre étude, où l'adsorption des ions calcium à la monocouche de DOPS neutraliserait les interactions électrostatiques entre les molécules du lipide, causant ainsi l'effet de condensation observé. En revanche, en absence de calcium, l'isotherme Π -A de la monocouche chargée, mesurée avec une expansion de l'aire moléculaire résulterait de l'interaction électrostatique répulsive entre les charges négatives des molécules de DOPS.

Les isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges cyt *c*-DOPS, mesurées en présence et en absence du CaCl_2 dans la sous-phase sont représentées respectivement dans les figures 34 et 35. Dans les deux cas, pour tous les mélanges étudiés, l'erreur expérimentale enregistrée sur l'aire moléculaire du point à pression de surface médiane entre le point de départ et le collapse est de $\pm 1.5 \%$. Pour les isothermes ΔV -A, les courbes sont reproductibles à $\pm 10 \text{ mV}$.

En présence d'ions calcium (1 mM) dans la sous-phase, l'observation des isothermes Π -A et ΔV -A (Fig. 34) montre que la quantité de protéine nécessaire à l'apparition du second collapse et donc de l'éventuelle séparation de phases est plus faible. En effet, à seulement une fraction molaire de cyt *c* de 0.04, le second collapse est clairement identifiable au niveau des courbes Π -A et ΔV -A. Ceci place dans ce cas le seuil de miscibilité de la protéine avec la DOPS à 2 % de cyt *c*. Au-dessus de 26 mN/m et de 300 mV, les isothermes des mélanges s'approchent des valeurs du lipide pur. En outre, étant donné que les valeurs du potentiel de surface du cyt *c* sont dans le même ordre d'amplitude que celles de la DOPS neutre, les potentiels de surface des mélanges cyt *c*-DOPS ne montrent pas de chute aux aires moléculaires inférieures à celle de second collapse comme montré ci-dessus, mais un plateau expliqué également par le phénomène de désorption. Au collapse, toutes les isothermes des mélanges atteignent les valeurs obtenues pour le lipide pur.

En absence d'ions calcium dans la sous-phase (Fig. 35), les isothermes Π -A et ΔV -A des mélanges montrent un seul collapse, celui du lipide, et ce, pour les fractions molaires de cyt *c* allant jusqu'à une valeur comprise entre 6 et 10 %. À 10 % et plus, un deuxième collapse (Π_{c2}) apparaît. Celui-ci, étant nettement visible sur les isothermes ΔV -A, a un comportement

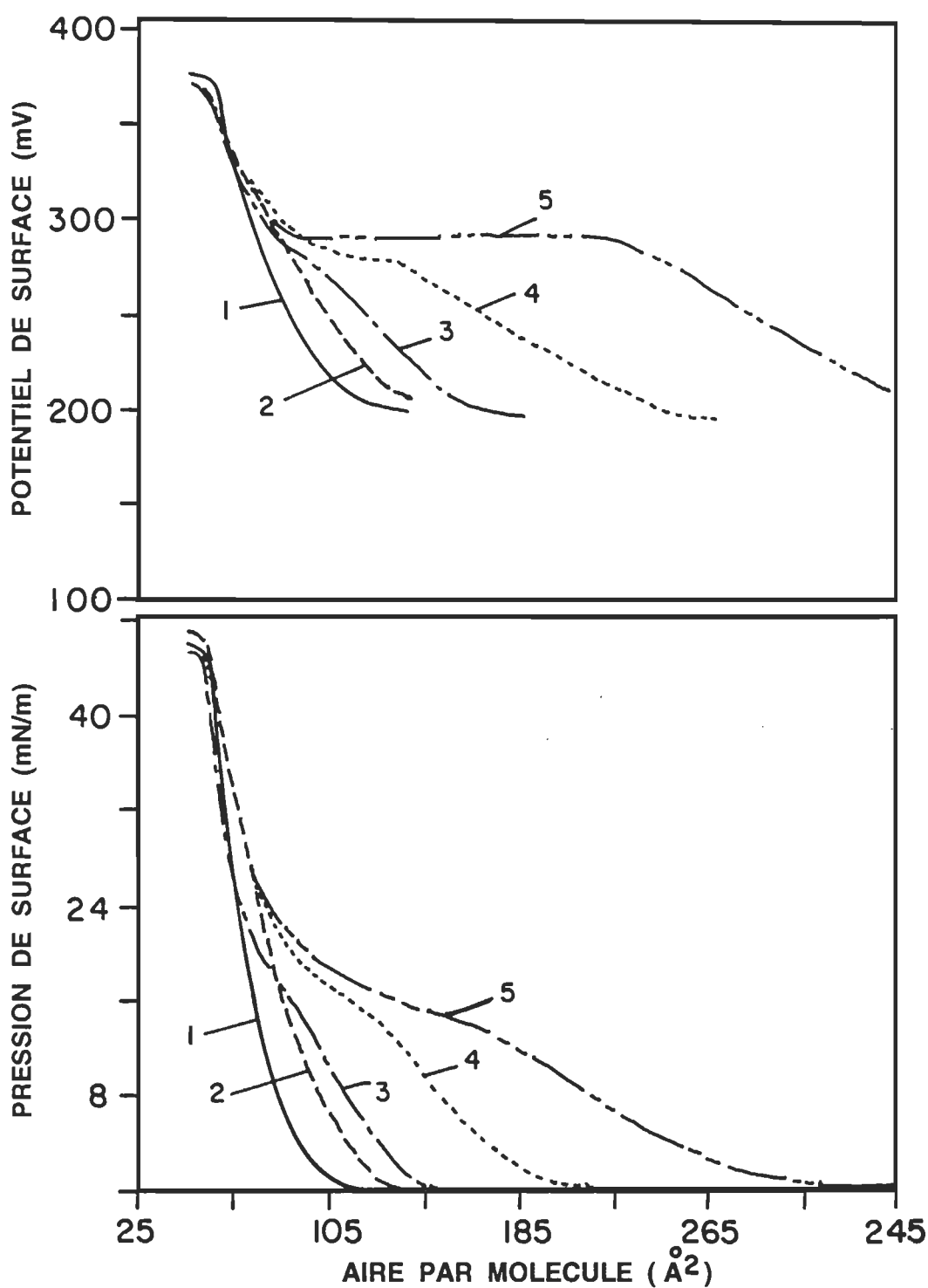


Fig. 34. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS pure (1) et des mélanges cyt *c*-DOPS aux fractions molaires suivantes de cyt *c*: 0.020 (2), 0.041 (3), 0.1 (4), et 0.200 (5). La sous-phase contient un supplément de CaCl_2 à une concentration de 1 mM. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

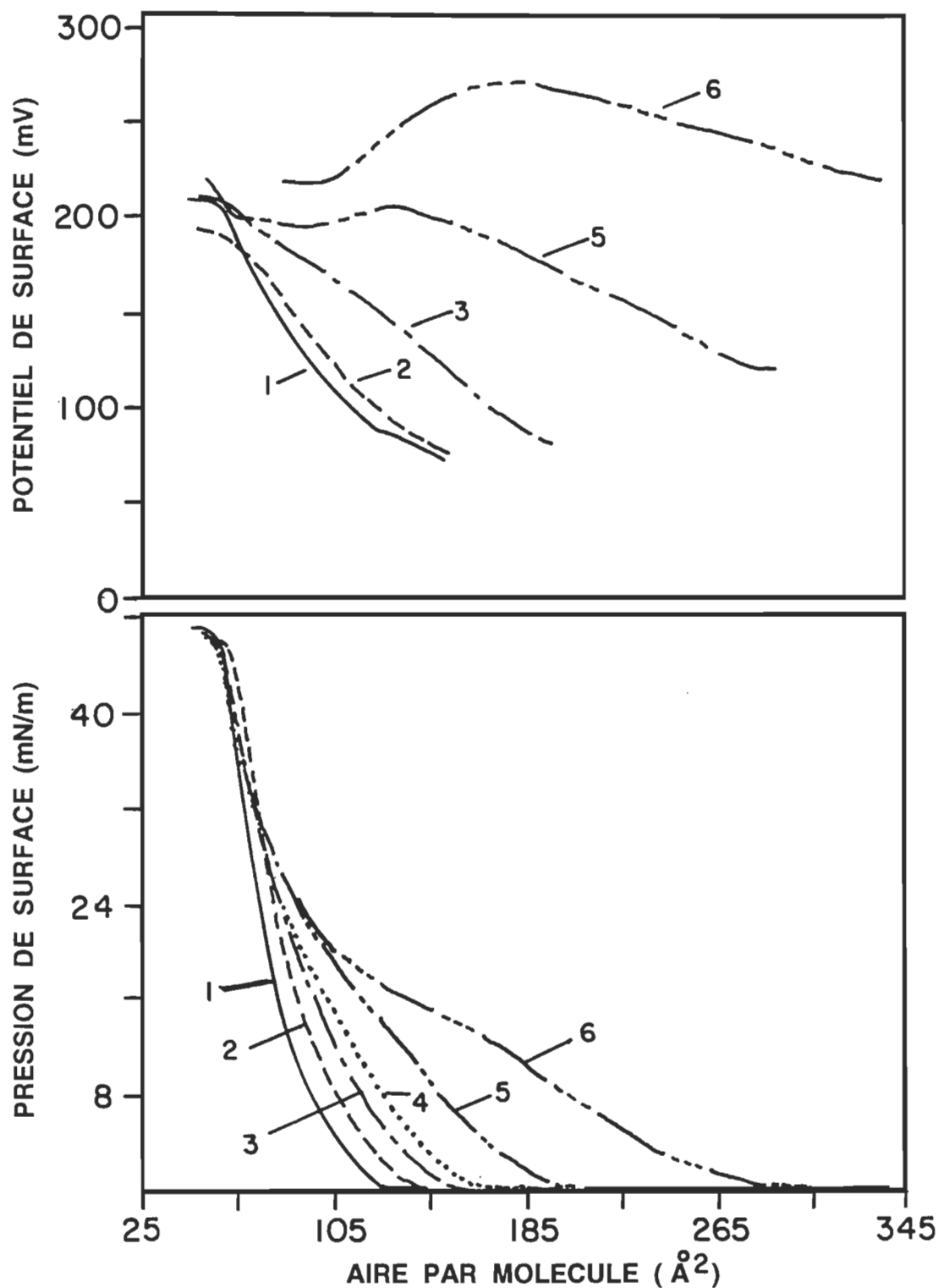


Fig. 35. Isothermes Π -A et ΔV -A de la DOPS pure (1) et des mélanges cyt c-DOPS aux fractions molaires suivantes de cyt c: 0.02 (2), 0.04 (3), 0.06 (4), 0.10 (5) et 0.20 (6). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

analogue à celui des mélanges *cyt c*-DOPC, avec une chute du potentiel de surface au-delà de Π_{c2} , causé par une désorption des molécules de *cyt c* et une tendance au retour à l'isotherme du lipide pur lorsque la pression de surface est voisine de 35 mN/m. Dans le cas des mélanges *cyt c*-DOPC, cette dernière est cependant d'environ 10 mN/m plus basse. Dans le cas de la présente étude, si on tenait compte uniquement du nombre de molécules de DOPS, toutes les isothermes seraient écartées de celle de la DOPS pure, ce qui indiquerait qu'une certaine quantité de molécules protéiques demeurent complexées avec les molécules lipidiques, peu importe la pression de surface appliquée. Par ailleurs, l'élévation du potentiel de surface observée dans les isothermes ΔV -A des mélanges (Fig. 35, courbes 5 et 6) est due à la contribution de celui des molécules de *cyt c* dont la valeur est nettement supérieure à celle de la DOPS (comparer Fig. 34 et 35). Par conséquent, la chute du potentiel de surface observée au-delà du second collapse serait due à l'élimination des molécules de *cyt c* de l'interface au-dessous de l'électrode suite à leur désorption.

Pour les mélanges *cyt c*-DOPS, l'application de la règle d'additivité de l'aire moléculaire en présence ou en absence d'ions calcium dans la sous-phase, donne deux résultats antagonistes. En présence du calcium dans la sous-phase, tous les points expérimentaux correspondant aux fractions molaires utilisées, sont décalés positivement par rapport à la droite prévue par la règle d'additivité (Fig. 36). Par contre, en absence d'ions calcium dans la sous-phase, le phénomène observé est réciproque, où le décalage devient négatif (Fig. 37). Le décalage négatif des points expérimentaux par rapport à la règle d'additivité appuie l'augmentation du seuil de miscibilité et l'existence d'une interaction entre le *cyt c* et la DOPS chargée négativement. En outre, ce décalage quoique petit et dont l'effet est inversé en présence

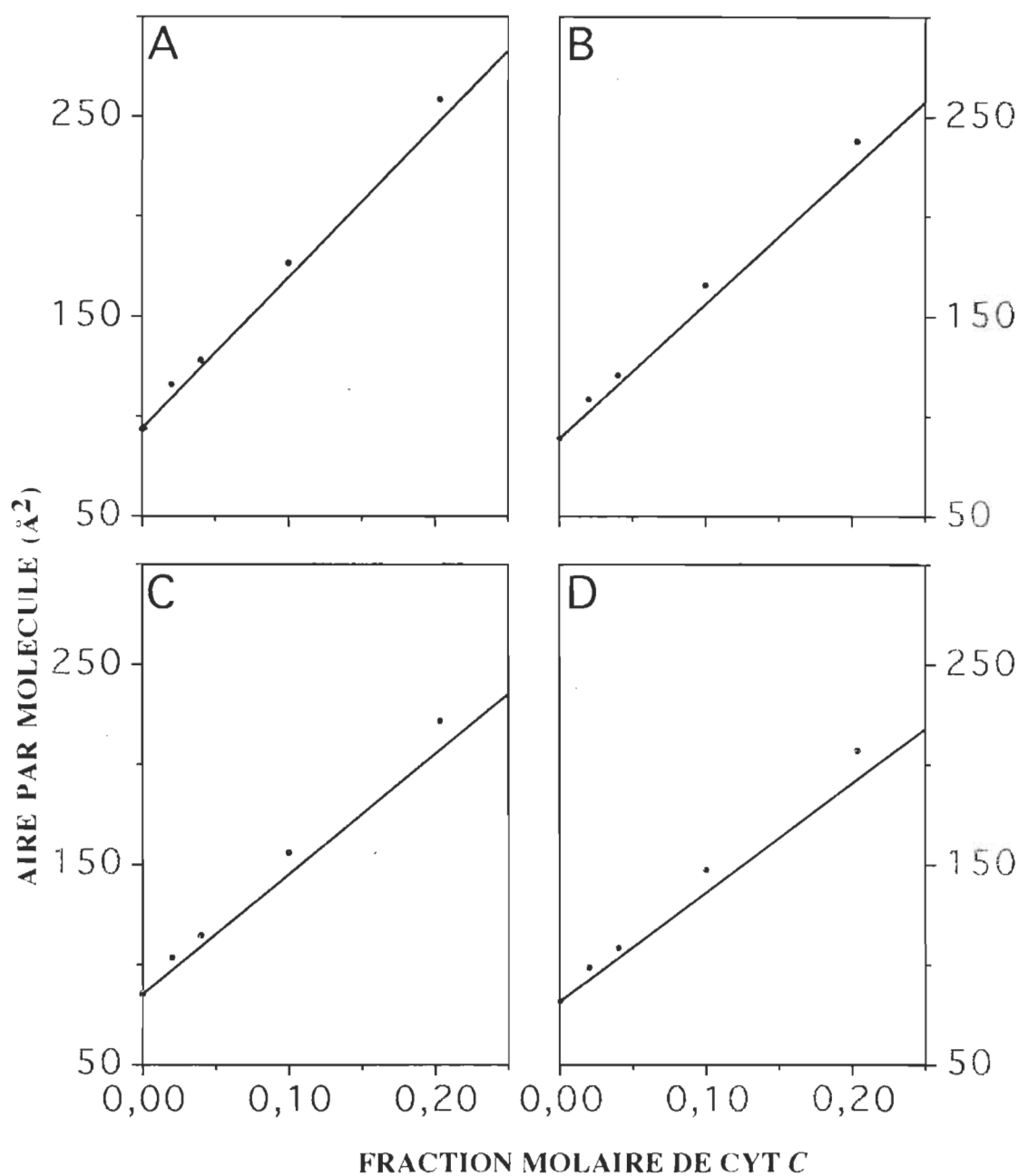


Fig. 36. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt *c*-DOPS. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 34 aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales. La sous-phase contient un supplément de CaCl_2 à une concentration de 1 mM.

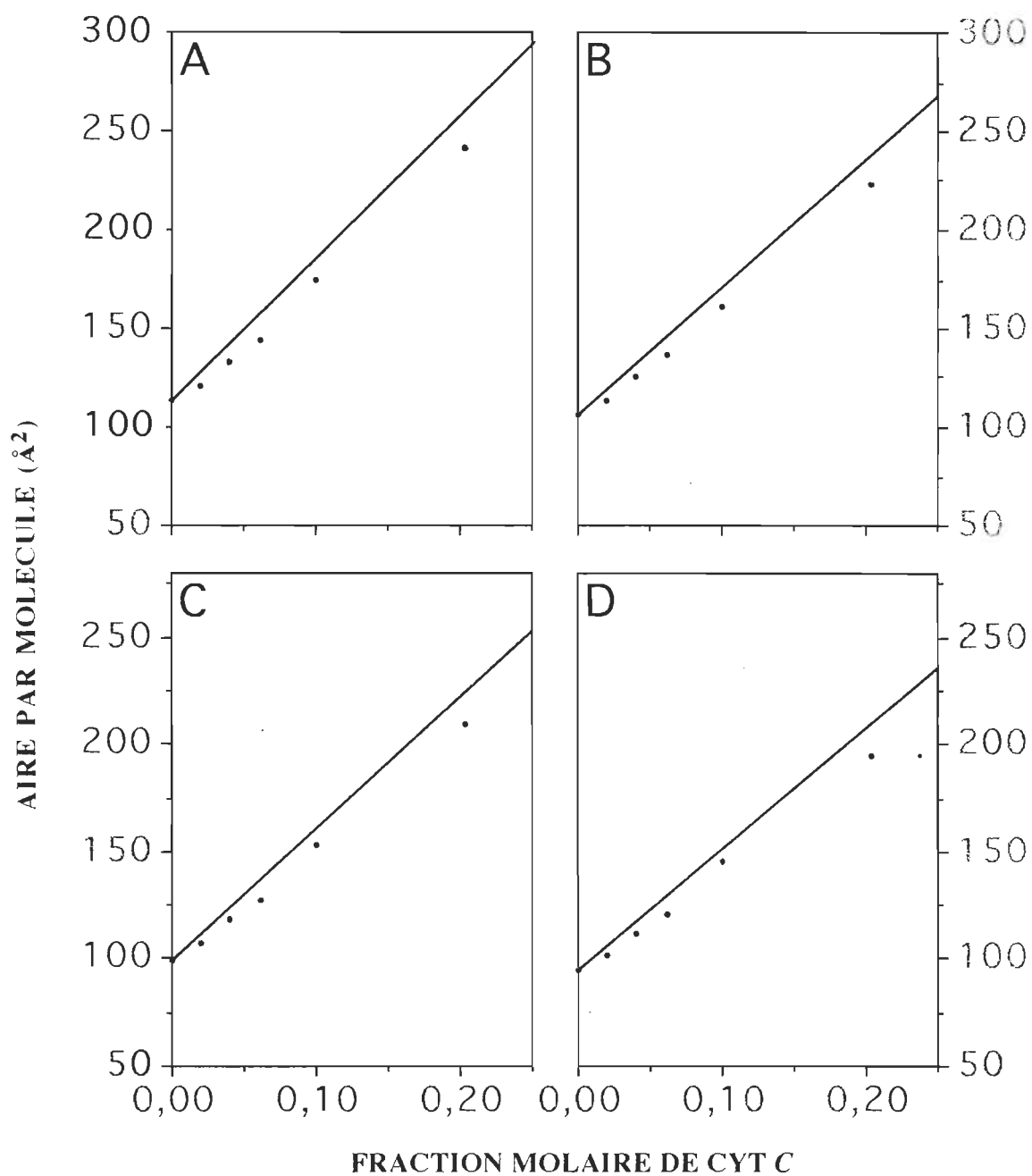


Fig. 37. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt *c*-DOPS. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 35 aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales.

d'ions calcium dans la sous-phase, est la preuve de l'influence qu'exerce ce type d'ions sur l'interaction électrostatique du *cyt c* avec la DOPS. Et puisqu'aux fractions molaires de *cyt c* supérieures à 0.02, le décalage positif par rapport à la règle d'additivité est plus prononcé, il peut être expliqué par le phénomène de séparation de phases ainsi que par le changement conformationnel de la protéine tel que suggéré ci-dessus dans le cas des mélanges *cyt f*-DOPC.

À partir des résultats représentés dans les figures 36 et 37, nous avons évalué -à l'aide de l'équation 2- l'énergie libre en excès du mélange. Les résultats présentés dans la figure 38 montrent par les valeurs négatives de cette énergie libre en excès dans le cas des mélanges *cyt c* -DOPS chargée, l'existence d'une interaction entre les molécules du mélange plus forte que celle existant entre les molécules dans la monocouche du constituant pur. En revanche, les valeurs positives de l'énergie libre en excès observées dans le cas des mélanges *cyt c* -DOPS neutre, peuvent être la conséquence d'une interaction faible entre les molécules des deux constituants aussi bien que d'un dépliement résultant du changement conformationnel du *cyt c*. Cette interaction étant plus faible que celle existant entre les molécules du constituant pur, les molécules de chaque constituant ont alors tendance à s'auto-associer pour former des domaines d'agrégats (Maget-Dana, 1989), un phénomène qui peut être assimilé à la séparation de phases. L'agrégation des molécules protéiques est également suggérée pour d'autres monocouches lipide-protéine où la protéine dépasse une concentration seuil (Heckl et Möhwald, 1987).

À la lumière des résultats discutés ci-dessus, il est clair que le *cyt c* dont la charge nette est positive à pH = 8, voit sa miscibilité augmenter avec la DOPS chargée négativement plutôt qu'avec son équivalent neutre. En

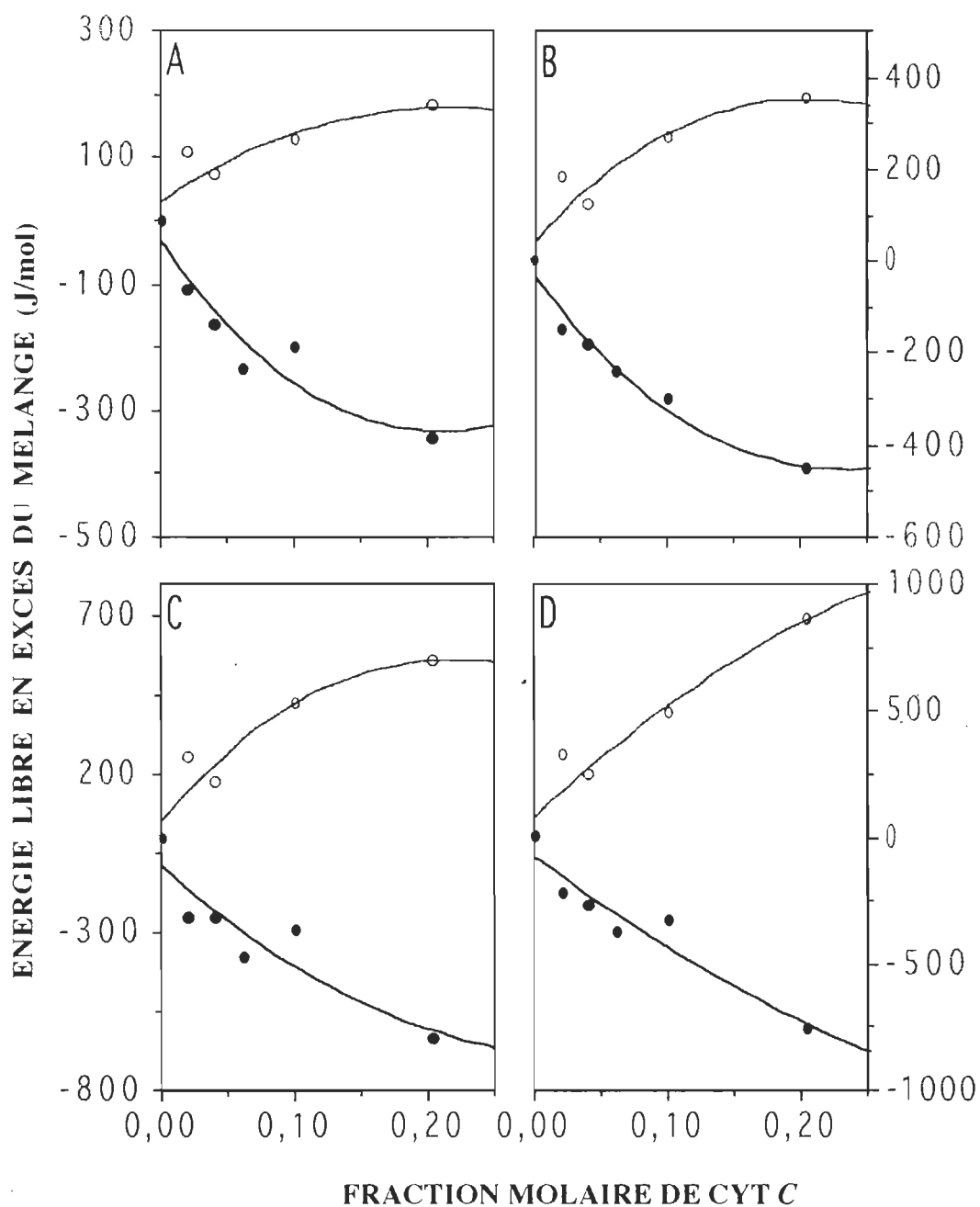


Fig. 38. Énergie libre en excès du mélange représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système *cyt c*-DOPS, en absence (cercles pleins) et en présence de calcium (1 mM de CaCl₂) dans la sous-phase (cercles vides). Les valeurs sont déduites graphiquement à partir des figures 34 et 35 et aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D).

d'autres termes, en absence d'ions calcium dans la sous-phase, il y a plus de molécules protéiques qui s'associent avec les molécules de la DOPS chargée. Ce phénomène est également bien documenté dans les études classiques d'adsorption d'une protéine de charge x à une monocouche lipidique neutre ou de charge opposée. L'adsorption préférentielle et quantitativement plus importante de la protéine ou du peptide à la monocouche lipidique chargée est clairement démontrée et expliquée par le caractère électrostatique de l'interaction (Quinn et Dawson, 1969; Morse II et Deamer, 1973; Teissie, 1981; Demel *et al.*, 1990; Batenburg *et al.*, 1988). D'autres chercheurs étudiant l'adsorption du cyt *c* à une multicouche d'acide gras ou de lipide de charge négative, sur un substrat solide par la méthode LB, ont montré l'importance du caractère électrostatique dans l'interaction (Pachence et Blasie, 1987; Pachence *et al.*, 1989, 1990; Pachence et Blasie, 1991). Dans leur étude, Pachence et Blasie (1987) supposent que les molécules de cyt *c* adsorbées à partir d'une solution pour s'organiser en une monocouche "compacte", où l'aire occupée par chaque molécule est de $833 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, sont disposées de telle sorte que leur groupement hème est orienté. Par ailleurs, le caractère électrostatique de l'interaction est mis en évidence par le fait que les molécules de cyt *c*, liées à l'acide stéarique, sont désorbées une fois mises en contact avec une solution aqueuse contenant 1 mM de KCl (Pachence et Blasie, 1987).

Dans une cellule vivante (Eucaryote ou Procaryote), la plupart des protéines synthétisées et destinées à l'exportation à l'extérieur du cytoplasme doivent traverser la membrane à l'aide d'un peptide signal (Gierasch, 1989). Ce peptide signal très hydrophobe, de 16 à 30 acides aminés, synthétisé comme une extension du N-terminal de la protéine, interagit avec d'autres complexes protéiques liés ou non à la membrane, afin de remplir sa fonction

de translocation (Killian *et al.*, 1990). Une fois que cette fonction est accomplie, le peptide signal est scindé de la protéine grâce à une enzyme, la signal peptidase, libérant ainsi la molécule protéique prête à remplir sa fonction physiologique (Liu *et al.*, 1989; Rawn, 1989). Chez *Escherichia coli*, un phénomène analogue est connu, où certaines protéines ou leurs précurseurs destinés à l'exportation -dont le peptide signal du N-terminal (Hartl *et al.*, 1990)- doivent être transportés à travers la membrane interne afin d'atteindre leur lieu fonctionnel cible. Afin d'assurer ce transport dont le mécanisme est encore mal élucidé, pendant et juste après leur synthèse, ces précurseurs interagissent avec plusieurs constituants du système de transfert transmembranaire, notamment les phospholipides (Kusters *et al.*, 1991). Le rôle des phospholipides de la membrane interne, chargés négativement, est mis en évidence dans ce transfert puisque dans les fragments membranaires provenant de mutants d'*E. coli*, dont la synthèse en phosphatidylglycérol (PG) -majeur phospholipide chargé de la membrane interne- est déficiente, ce transport est sévèrement empêché (De Vrije *et al.* 1988; Lill *et al.*, 1990). En revanche, dans les fragments provenant de mutants dont la synthèse de PG est induite, ce transfert est rétabli (Lill, *et al.*, 1990; Kusters *et al.*, 1991). En outre, seule la charge et non la spécificité du lipide est le paramètre de base pour le rétablissement de cette fonction de transfert puisque la substitution de la PG par d'autres phospholipides acides, comme la PS ou la cardiolipine, a donné des résultats similaires (Kusters *et al.*, 1991). L'implication des lipides de charge négative dans le transfert trans-membranaire de la protéine pourrait être à l'origine de la fonction de liaison de la protéine ou de son peptide signal à la membrane biologique afin d'assurer ce transfert (Kusters *et al.*, 1991).

Dans l'exemple que nous venons de citer, les phospholipides chargés de la membrane interne sont nécessaires au transport transmembranaire des protéines extracellulaires ou de leurs précurseurs dans un but constructif, c'est-à-dire, afin de promouvoir les fonctions physiologiques de la bactérie. Un second exemple impliquant un transport semblable, mais dans un but destructif, est celui de la pénétration de la toxine de diphtérie dans une cellule vivante. Cette protéine sécrétée par *Corynebacterium diphtheria* est constituée de deux domaines reliés par un pont disulfure, un domaine hydrophile A, et un domaine plus hydrophobe B (Rawn, 1989; Jiang *et al.*, 1991). Après infection de la cellule vivante par la toxine, le domaine A est transféré à travers la membrane pour être libéré dans le cytoplasme et inhiber la synthèse protéique. Bien que la translocation de cette protéine à travers la membrane -encore mal connue- se fasse sans l'aide d'un peptide signal, il semble qu'elle se fasse par un changement conformationnel de la protéine la rendant hydrophobe, suite à son interaction avec certains organites cellulaires acides comme les endosomes (pour revue, voir Jiang *et al.*, 1991). À pH acide, on a montré que cette protéine adopte une conformation plus expansée et hydrophobe, capable de pénétrer dans les monocouches lipidiques dont la tête polaire est de préférence munie d'une charge négative (Demel *et al.*, 1991). Donc c'est ce changement conformationnel relié au processus de dénaturation de la toxine par le pH acide qui pourrait être l'une des étapes dans la voie de la compréhension du mécanisme de la translocation des protéines à travers les membranes vivantes.

Dans les deux exemples cités ci-dessus, concernant le transport des protéines d'*E. coli* et de la toxine diphtérique à travers une membrane vivante, lors de ce transport, la protéine interagit nécessairement avec les

lipides chargés négativement de la membrane (ou du feuillet) interne. À ce stade du transport, il est logique de penser que, due à la charge négative du lipide qu'elle contient et, dont le rôle dans l'interaction avec les protéines basiques est bien démontré *In vivo* et dans les modèles membranaires, la membrane devient apte à recevoir plus de molécules protéiques sans perturbation de sa structure lors du transport. Dans le modèle de la monocouche, nous avons démontré que le seuil de miscibilité du cytochrome *c* augmente en présence de la DOPS chargée. La DOPS ne diffère pas beaucoup de la DOPC, sinon par la charge négative qu'elle porte. Leurs chaînes latérales ayant la même structure, elles forment toutes les deux une monocouche expansée et donnent sur le même substrat des isothermes Π -A très rapprochées (tableaux 4 et 6). Cependant, leur interaction avec le cytochrome *c* a donné des résultats très différents avec un seuil de miscibilité de la protéine, 6 à 10 fois plus élevé avec la DOPS qu'avec la DOPC. Par ailleurs, lorsque la charge de la DOPS est neutralisée par le calcium, ce seuil de miscibilité est réduit de façon appréciable pour approcher celui observé avec la DOPC.

Le rôle du calcium dans diverses fonctions cellulaires, notamment dans la physiologie nerveuse et musculaire, est bien documenté. Pour en savoir plus, le lecteur est invité à lire les livres édités par Rubin et al. (1985), et Fiskum (1989). Tout comme pour les ions Na^+ et K^+ , la concentration cellulaire en ions calcium est contrôlée par une pompe ionique, la Ca^{++} ATPase. Logée dans la membrane du globule rouge ou du réticulum endoplasmique du sarcoplasme par exemple, cette pompe fonctionne au besoin pour garder la concentration en Ca^{++} du cytosol à son niveau normal, soit de 10^{-7} à 10^{-6} M (Darnell *et al.*, 1988; Rawn, 1989). Par exemple, lors d'une contraction musculaire, les citernes du réticulum

sarcoplasmique riches en Ca^{++} ($\approx 10^{-3}$ M), libèrent cet ion dans le sarcoplasme dont la concentration peut atteindre 100 fois la normale. Afin de maintenir le couplage contraction-décontraction des fibres musculaires, la Ca^{++} ATPase pompe le calcium en excès du cytosol pour le ramener au réticulum sarcoplasmique (Darnell *et al.*, 1988; Rawn, 1989).

Dans les exemples que nous avons mentionné ci-dessus concernant le transport des protéines à travers la membrane, nous avons pu savoir que celles-ci le font par interaction avec les lipides portant une charge négative. Nous n'avons pas rencontré d'implication du calcium intracytoplasmique, ou de mesure faite sur celui-ci lors de l'étape de séparation de la protéine de la membrane. Si une telle situation est possible, elle expliquerait les différences observées dans la miscibilité en monocouche, du cyt *c* avec la DOPS, en présence et en absence des ions calcium dans la sous-phase. Ceci nous mène à proposer le modèle suivant pour l'interaction du cyt *c* avec la DOPS (Fig. 39): (i) en présence des ions calcium dans la sous-phase (partie A), les ions causent une condensation de la monocouche en s'associant aux molécules de DOPS comme suggéré par Gregory et Ginsberg (1984). Ainsi, chaque ion calcium se couple à deux molécules de DOPS neutralisant ainsi leur charge, ce qui résulte en l'annulation de la répulsion électrostatique. Lorsque la solution protéique est répandue, les molécules de cyt *c* s'insèrent entre les molécules de DOPS neutre de la même façon qu'elles l'auraient fait avec les molécules de DOPC, donnant une monocouche mixte, dont les interactions intermoléculaires sont de type hydrophobe ou de type polaire autre qu'électrostatique. Ces interactions normales valables pour la majeure partie des lipides, constituant la membrane biologique, font en sorte que le seuil de miscibilité du cyt *c* avec

la DOPS neutre est bas et comparable à celui obtenu avec la phosphatidylcholine. (ii) En absence des ions calcium dans la sous-phase, la DOPS est chargée et, l'épandage du *cyt c* à divers points de la monocouche lipidique, cause une complexation lipide-protéine maintenue par une interaction électrostatique (Fig. 39, partie B). De cette interaction forte résulte l'incorporation d'une grande quantité de *cyt c* telle que révélée par l'augmentation du seuil de miscibilité.

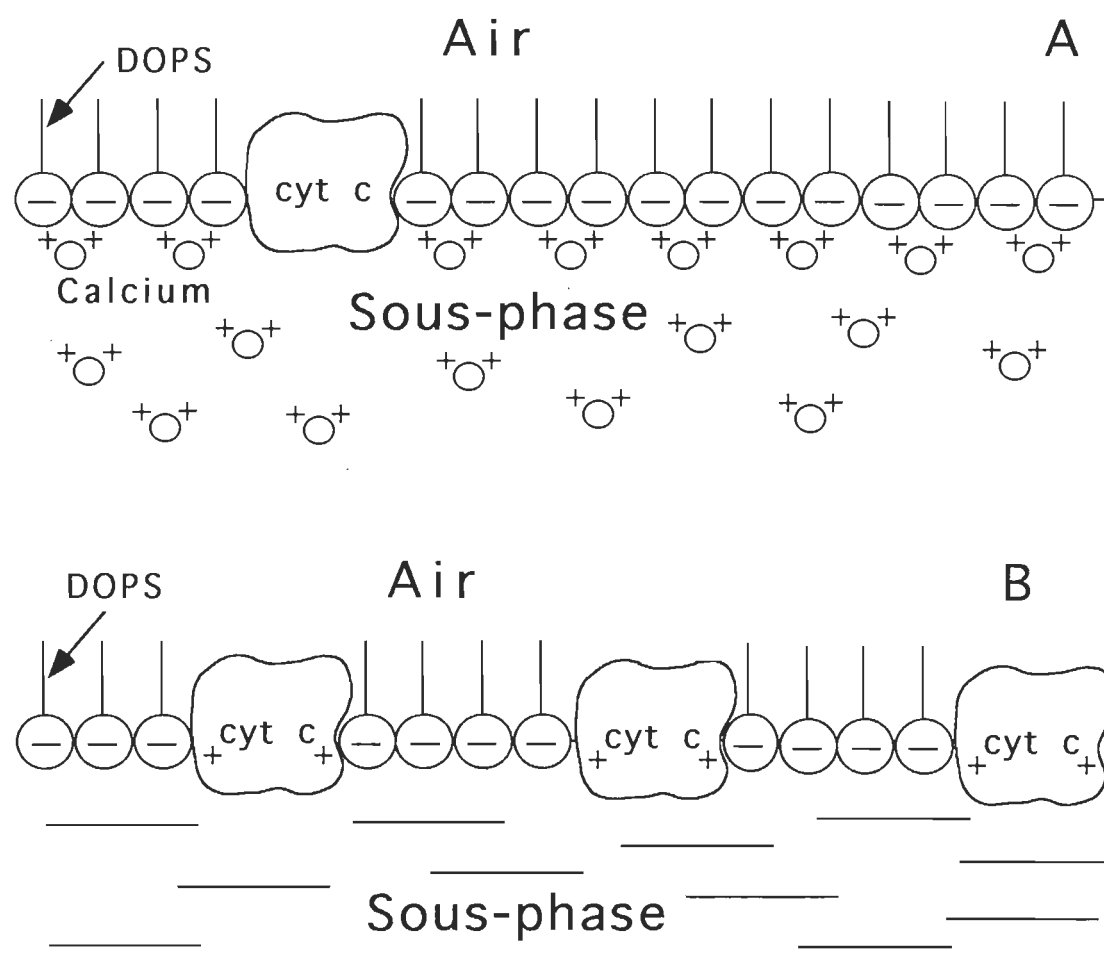


Fig. 39. Schéma du modèle de l'interaction du *cyt c* avec la DOPS chargée et neutre. Sous-phase: tampon Tris-HCl, 1 mM, pH = 8, avec 1 mM de CaCl_2 (A), et sans CaCl_2 (B).

Le modèle que nous avons proposé pour l'interaction neutre ou électrostatique du cyt *c* avec la DOPS peut avoir une implication *in vivo* dans le processus d'incorporation de protéine extracytoplasmique, en l'occurrence, le domaine A de la toxine de diphtérie. Lors de la formation du cyt *c* couplée avec son incorporation à travers la membrane mitochondriale externe, il est suggéré que la structure native de cette protéine est achevée *via* le couplage apocyt *c* -hème au niveau de la membrane (Nicholson *et al.*, 1987). D'après ce modèle, avant même sa libération dans l'espace intermembranaire mitochondrial et l'accomplissement de sa pleine fonction physiologique, le cyt *c* interagit avec les lipides membranaires, notamment ceux qui portent une charge électrique négative. Dans ces conditions, les cations peuvent jouer un rôle dans la phase finale de libération du cyt *c* de la membrane. Puisque ce modèle peut refléter la réalité, l'étude de l'interaction cyt *c* -lipide en monocouche présentée ci-dessus, peut avoir un impact important dans la compréhension du phénomène d'importation de cette protéine. Ainsi, au cours de ce transfert, l'apocyt *c* interagirait fortement avec les lipides chargés négativement de la membrane. Après le couplage apocyt *c* -hème, les cations interagiraient avec les lipides chargés de la membrane libérant ainsi le cyt *c* de la membrane et causant une réduction de la miscibilité de ces deux constituants.

3. 2. 3. 3. Interaction du cyt *c* avec les lipides membranaires

Jusqu'ici, l'interaction du cyt avec les lipides est étudiée dans les monocouches mixtes impliquant les phospholipides synthétiques. Afin de s'approcher du modèle membranaire en l'occurrence celui du thylacoïde, nous nous proposons dans cette section, d'étudier l'influence de deux lipides membranaires, le MGDG et la Chl *a* sur la miscibilité et l'interaction avec

les cyt *c* ou *f*. Ces deux lipides exclusivement rencontrés dans la membrane photosynthétique, jouent un rôle important dans l'aspect architectural et fonctionnel de cette "machine" où siège la photosynthèse (Voir chapitre 1). Par exemple, on sait bien que toutes les chlorophylles actives dans la photosynthèse, sont liées à des protéines, dans des complexes chlorophylle-protéine (Anderson, 1975), qui ont été caractérisés sous forme cristalline (Sato et Butler, 1978; Li, 1985). Pour comprendre le mécanisme de base des interactions qui existent dans ces complexes pigment-protéine, une importante approche est de les reconstituer dans des systèmes modèles bien définis. La formation de complexes protéine-chlorophylle en solution où les constituants macromoléculaires utilisés sont les biopolymères synthétiques (Inamura *et al.*, 1983; 1988) ou l'albumine sérique (Shibata *et al.*, 1986) a été rapportée. Dans le modèle de monocouche, utilisant les mesures de pression et de radioactivité de surface pour investiguer l'interaction résultant de l'adsorption du cyt *c* à une monocouche de Chl *a* (Lamarche *et al.*, 1988a), une forte interaction cyt *c*-Chl *a* a été observée. La technique de monocouche a été également très utile dans l'étude des propriétés interfaciales du MGDG (Tancrède *et al.*, 1981; Almog *et al.*, 1988) aussi bien que des pigments du chloroplaste en relation avec la photosynthèse (Aghion *et al.*, 1969; De Costa *et al.*, 1972; Liljenberg et Selstam, 1980; Tancrède *et al.*, 1982; Lamarche *et al.*, 1988a; Es-Sounni et Leblanc, 1992).

Dans le travail qui suit nous décrirons les propriétés interfaciales du MGDG et des mélanges cyt-MGDG et cyt *c*-Chl *a*. Les propriétés interfaciales de la Chl *a* et du cyt *c* sont respectivement décrites ci-dessus dans les sections 3. 1. 1. 1 et 3. 2. 1. 2. 1. Dans le cas du système cyt *c*-Chl *a*, nous utiliserons en plus, les techniques de spectroscopie infrarouge

par transformée de Fourier (FTIR) pour les films LB, afin d'étudier d'une part, l'effet de la complexation du cyt *c* avec la Chl *a*, et d'autre part, l'état d'agrégation de la Chl *a* et de la conformation de la protéine.

3. 2. 3. 3. 1. Cas du système cyt *c* -MGDG

Les isothermes Π -A et ΔV -A du MGDG sont représentées dans la figure 40. Ces courbes moyennes résultent de 10 à 12 expériences issues de 4 pesées différentes du lipide. L'erreur obtenue sur l'aire moléculaire à 30 mN/m est de ± 1 %. D'autres valeurs déduites de l'isotherme Π -A sont comparées à celles rapportées par d'autres chercheurs dans le tableau 7. Les

Tableau 7. Comparaison des valeurs déduites des isothermes Π -A du MGDG entre notre travail et ceux d'autres chercheurs.

Référence	Substrat	Π_c (mN/m)	Aire par molécule (\AA^2)			
			A^c	A^d	A^{30}	A^{40}
1	Tris-HCl, 1 mM pH = 8	42.2	61	137	69	63
2	Eau pure	-	-	135	65	62
3	Phosphate, 1 mM pH = 7.8	42	56	132	63	59

A: L'exposant indique la valeur de la pression de surface.

c: Collapse.

d: Aire où débute la pression de surface.

1: Notre travail.

2: Bishop et al., 1980.

3: Tancredi et al., 1981.

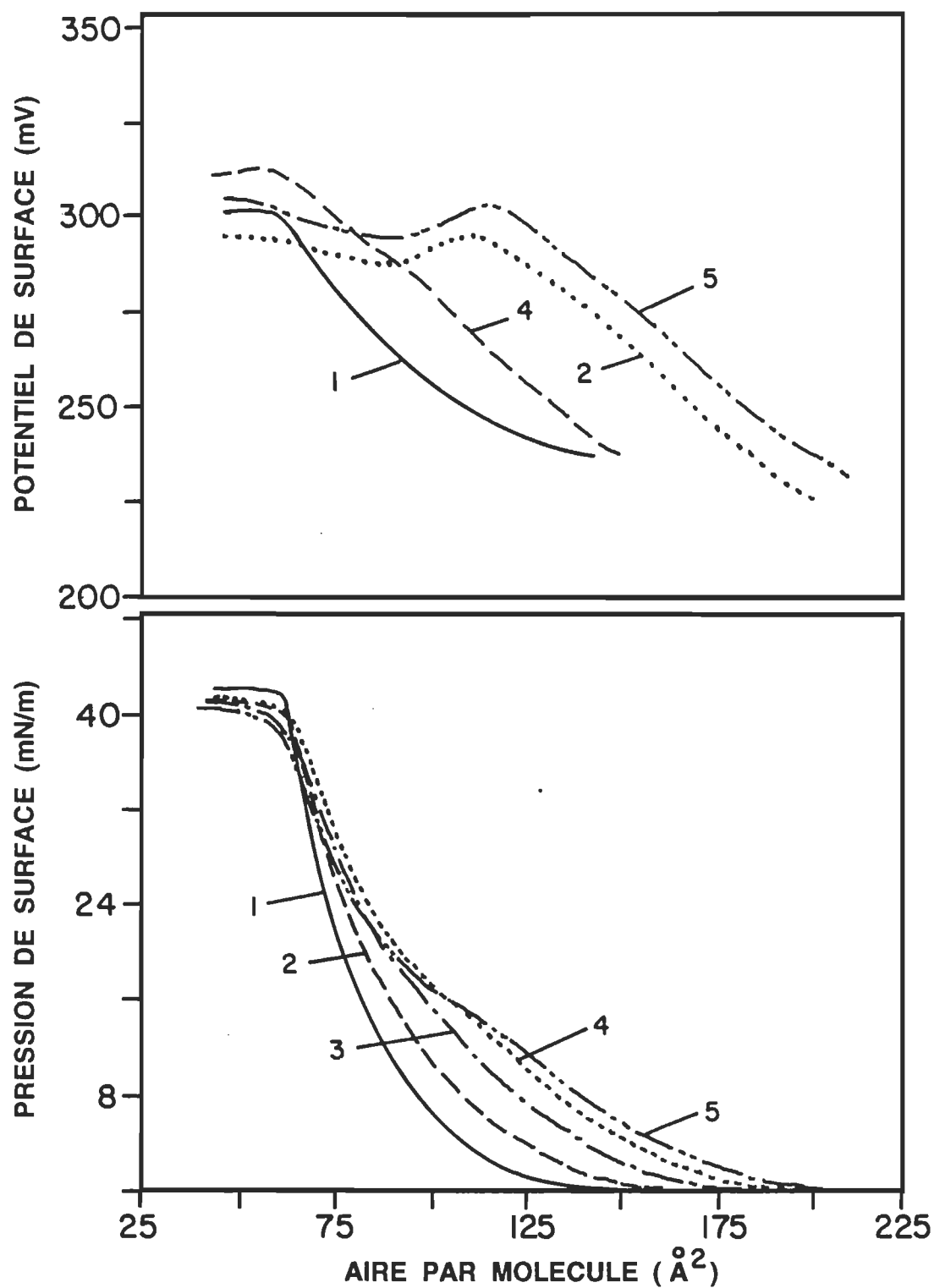


Fig. 40. Isothermes Π -A et ΔV -A du MGDG pur (1) et des mélanges cyt *c*-MGDG aux fractions molaires suivantes de cyt *c*: 0.010 (2), 0.023 (3), 0.041 (4), et 0.061 (5). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

faibles différences observées peuvent être dues soit aux différentes espèces végétales utilisées comme source d'extraction du lipide, soit aux différences notées dans la constitution de la sous-phase.

L'isotherme ΔV -A du MGDG montre une croissance continue du potentiel de surface de 236 mV (valeur au début de pression de surface) à 302 mV (valeur au collapse). L'erreur expérimentale est de ± 10 mV et le collapse est tout comme dans le cas de l'isotherme Π -A caractérisé par un plateau.

Contrairement à ce qui a été rapporté par Almog *et al.* en 1988 faisant état d'une grande instabilité (avec une importante réduction de la pression de surface à l'arrêt de compression) de l'isotherme Π -A d'une monocouche de MGDG exposée à l'air au lieu de l'azote, nos expériences reproduites dans des conditions similaires n'ont montré aucun signe d'hystérèse au niveau des courbes. En outre, après avoir comprimé une monocouche jusqu'au collapse, celle-ci est restée stable pendant 6 heures à une pression de surface de 40 mN/m (seulement 2 mN/m inférieure à la pression au collapse). De plus, les isothermes Π -A et ΔV -A d'une solution de MGDG emmagasinée pendant plus de 8 mois à -20°C n'ont pas montré de différences à l'erreur expérimentale près avec les courbes représentées dans la figure 40. Ces constatations sont en faveur de la bonne stabilité du MGDG en monocouche et en solution de conservation.

Les mélanges *cyt c*-MGDG et *cyt f*-MGDG sont caractérisés par des isothermes Π -A et ΔV -A qui sont illustrées dans les figures 40 et 41. L'étude de ces deux systèmes a donné des résultats similaires aux autres systèmes étudiés dans les sections précédentes. L'utilisation de ce lipide membranaire dont la tête polaire est plus complexe que celle de la

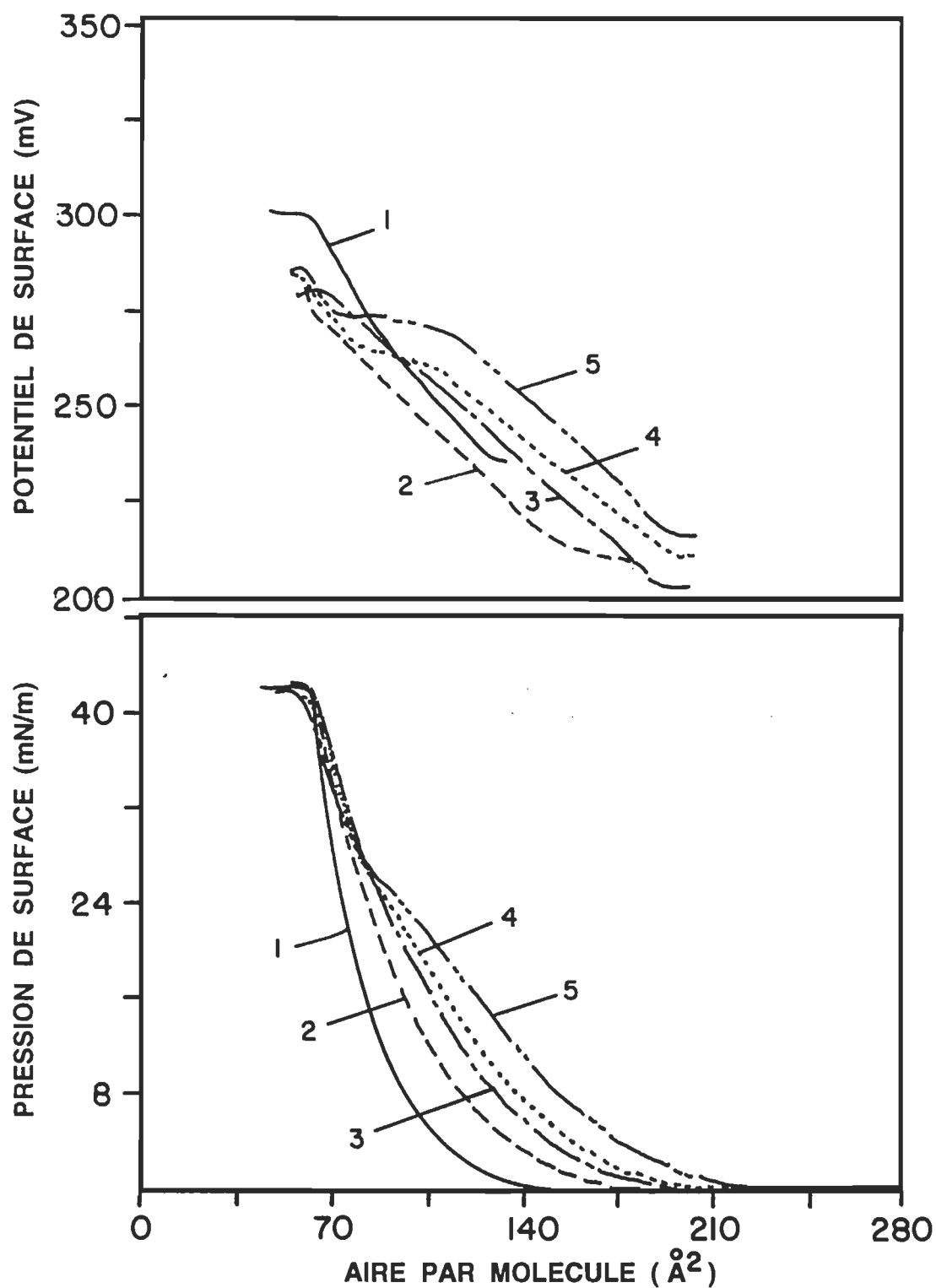


Fig. 41. Isothermes Π -A et ΔV -A du MGDG pur (1) et des mélanges cyt *f*-MGDG aux fractions molaires de cyt *f* suivantes: 0.01 (2), 0.020 (3), 0.032 (4), et 0.050 (5). Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

phosphatidylcholine a donné une miscibilité latérale avec les deux protéines plus élevée que celle obtenue avec la DOPC. Pour les deux systèmes *cyt c*-MGDG et *cyt f*-MGDG, ce seuil au-dessus duquel les isothermes Π -A et ΔV -A montrent deux collapsés est situé à une fraction molaire approximative de la protéine de 2 %.

L'application de la règle d'additivité de l'aire moléculaire aux mélanges *cyt c*-MGDG et *cyt f*-MGDG a donné dans les deux cas des résultats comparables avec un décalage positif par rapport au mélange idéal pour tous les points expérimentaux (Fig. 42, 43). Ce décalage peut être dû à une interaction spécifique aussi bien qu'une incompatibilité entre les deux constituants. Dans le cas du potentiel de surface, dépassant le seuil de miscibilité de 2 % de *cyt c*, nous avons obtenu des isothermes avec de plus en plus de fluctuations dépassant même l'erreur expérimentale au fur et à mesure qu'on augmentait la concentration de *cyt c* dans le film. Ces deux observations peuvent indiquer une incompatibilité entre les deux constituants et une séparation de phase dans les mélanges à grande concentration de *cyt c*.

3. 2. 3. 3. 2. Cas du système *cyt c*-Chl *a*

3. 2. 3. 3. 2. 1. Complexation de la Chl *a* et du *cyt c*: isothermes Π -A des mélanges et spectres d'absorption.

L'absorption dans la région du rouge de la Chl *a* en solution dans l'éthanol (Szalay *et al.*, 1973) est caractérisée par une faible bande d'énergie où le maximum est situé à 665 nm. Cela correspond à une transition électronique polarisée le long de l'axe Y du système conjugué électron- Π du noyau porphyrinique, connu sous le nom de transition Q_Y (Sauer, 1975). Lorsqu'une faible quantité de solution éthanolique de Chl *a* est injectée

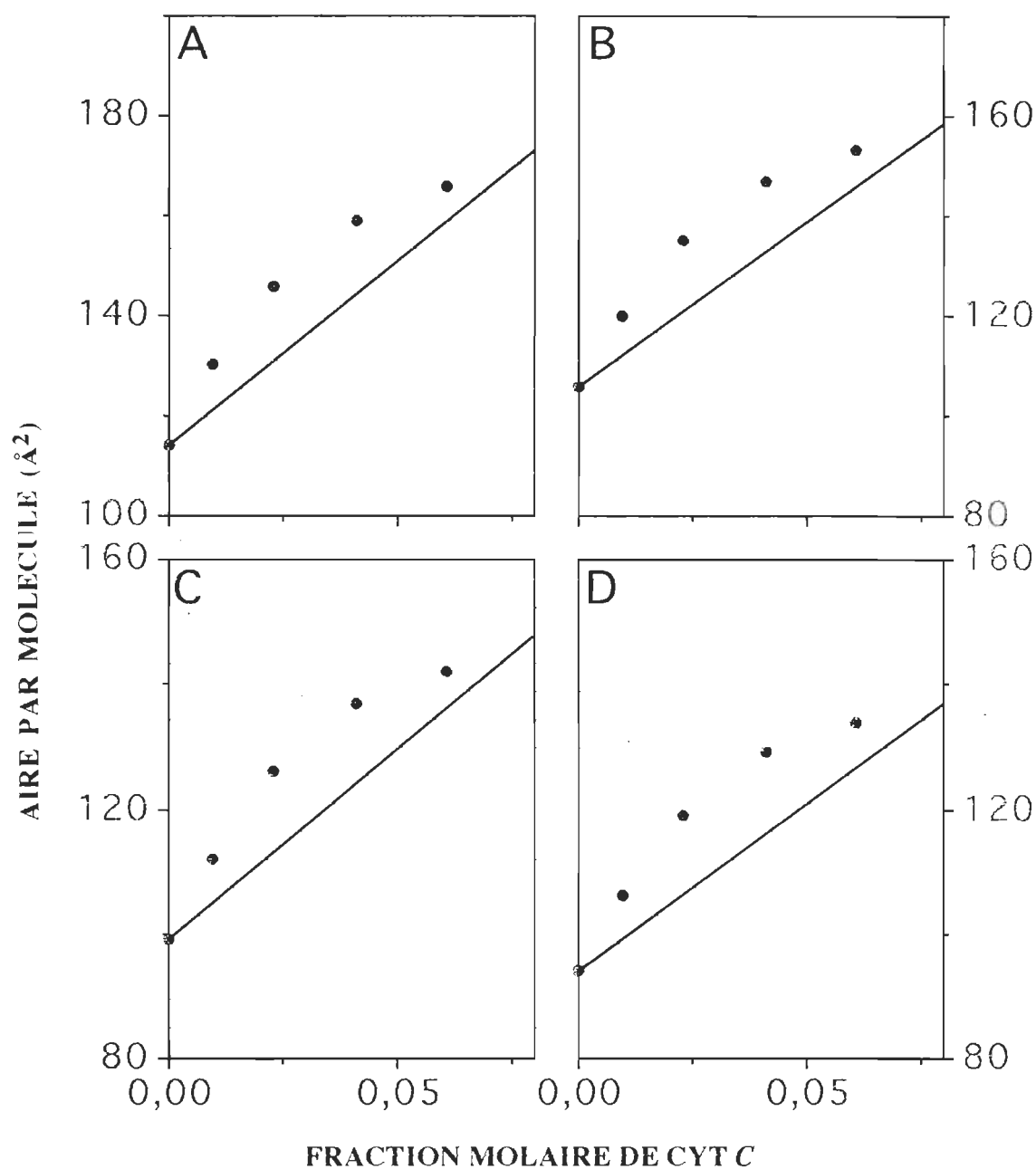


Fig. 42. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt *c* -MGDG. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 40 aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales.

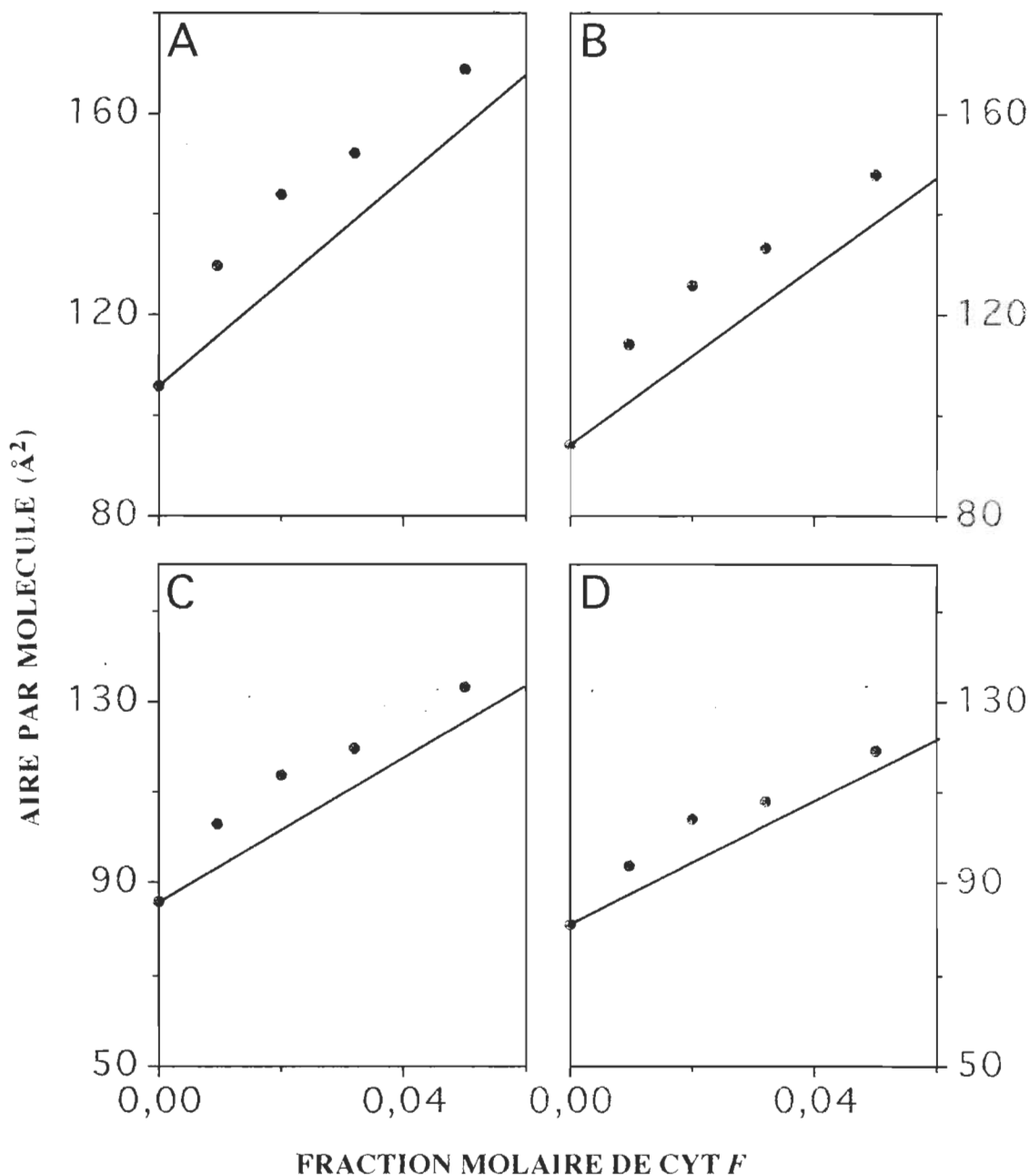


Fig. 43. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système *cyt f*-MGDG. Les valeurs sont déduites graphiquement à partir de la figure 41 aux pressions de surface de: 5 mN/m (A), 9 mN/m (B), 13 mN/m (C) et 17 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent respectivement les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales.

dans l'eau pour obtenir un mélange éthanol/eau de 3:97, v:v ($\approx 10^{-5}$ M de Chl *a*), l'énergie de la transition Q_Y de la Chl *a* diminue donnant lieu à une large bande d'absorption avec un maximum à 675 nm et un épaulement à 700 nm (Fig. 44, courbe 1). Ces changements spectraux peuvent être attribués à la formation d'une nouvelle forme spectrale caractérisant

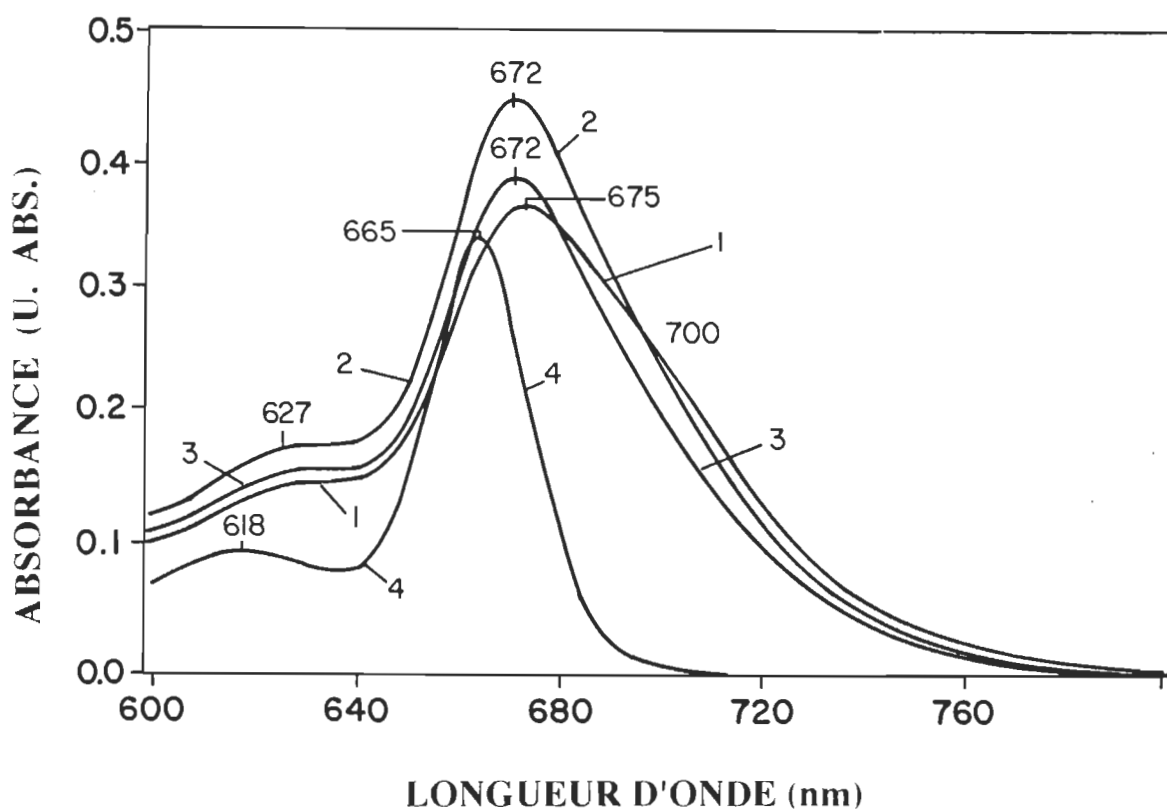


Fig. 44. Spectres d'absorption dans la région du rouge de la Chl *a* pris dans différentes solutions: la solution éthanolique de Chl *a* (10^{-5} M) est injectée dans l'eau avec un rapport eau:éthanol de 3:97, v:v (1); après injection de la solution éthanolique de Chl *a* (10^{-5} M) dans une solution aqueuse de cyl *c* (10^{-7} M, avec un rapport eau:éthanol 3:97, v:v) on obtient la courbe (2); la courbe (3) est obtenue après une centrifugation de 10 minutes à 6 000 g dans le but d'éliminer l'excès de Chl *a* sous forme agrégée; et la courbe (4) représente l'échantillon précédent après l'ajout d'éthanol à une concentration finale de 60 %.

l'agrégation des molécules de Chl *a* (Shipman *et al.*, 1976; Inamura *et al.*, 1983; Krawczyk *et al.*, 1988). Par ailleurs, lorsque la même expérience est répétée en utilisant une solution aqueuse de cyt *c* ($\approx 10^{-7}$ M) à la place de l'eau pure, on observe une seule bande d'absorption à 672 nm (Fig. 44, courbe 2). Cette caractéristique spectrale peut être attribuée à la formation en solution d'un complexe Chl *a*-cyt *c* puisque l'élimination par centrifugation de l'excès agrégé des molécules de Chl *a* n'affecte pas le maximum d'absorption (Fig. 44, courbe 3). Un résultat similaire obtenu dans notre laboratoire pour un film LB de mélange Chl *a*-cyt *c*, a été interprété en terme d'une dilution des molécules de Chl *a* par les molécules de cyt *c* qui lui sont associées (Lamarche *et al.*, 1990). La stabilité du complexe Chl *a*-cyt *c* formé en solution est grandement affectée par l'augmentation du rapport éthanol/eau; ce qui montre clairement une destruction progressive du complexe puisqu'à 60 % d'éthanol, le spectre d'absorption (Fig. 44, courbe 4) correspond à celui rapporté pour la Chl *a* en solution dans l'éthanol pur (Szalay *et al.*, 1973). Cependant, dans notre cas ce solvant dont plus de 60 % est de l'éthanol, et qui représente le solvant utilisé pour l'épandage du cyt *c*, préserve le rapport molaire Chl *a*/ cyt *c*.

L'isotherme Π -A du complexe Chl *a*-cyt *c* est représentée dans la figure 45. Puisque le nombre de molécules de Chl *a* dans la solution d'épandage du complexe est inconnu, l'aire moléculaire du complexe est calculée en tenant compte du nombre de molécules de cyt *c* seulement. Le décalage observé dans le cas de l'isotherme par rapport à celle du cyt *c*, est relié à la contribution des molécules de Chl *a*, préalablement complexées à celles du cyt *c* avant l'ajout de l'éthanol et l'épandage à l'interface air/eau. Le nombre de molécules de Chl *a*, n , responsable du décalage observé, est calculé à l'aide de l'expression suivante:

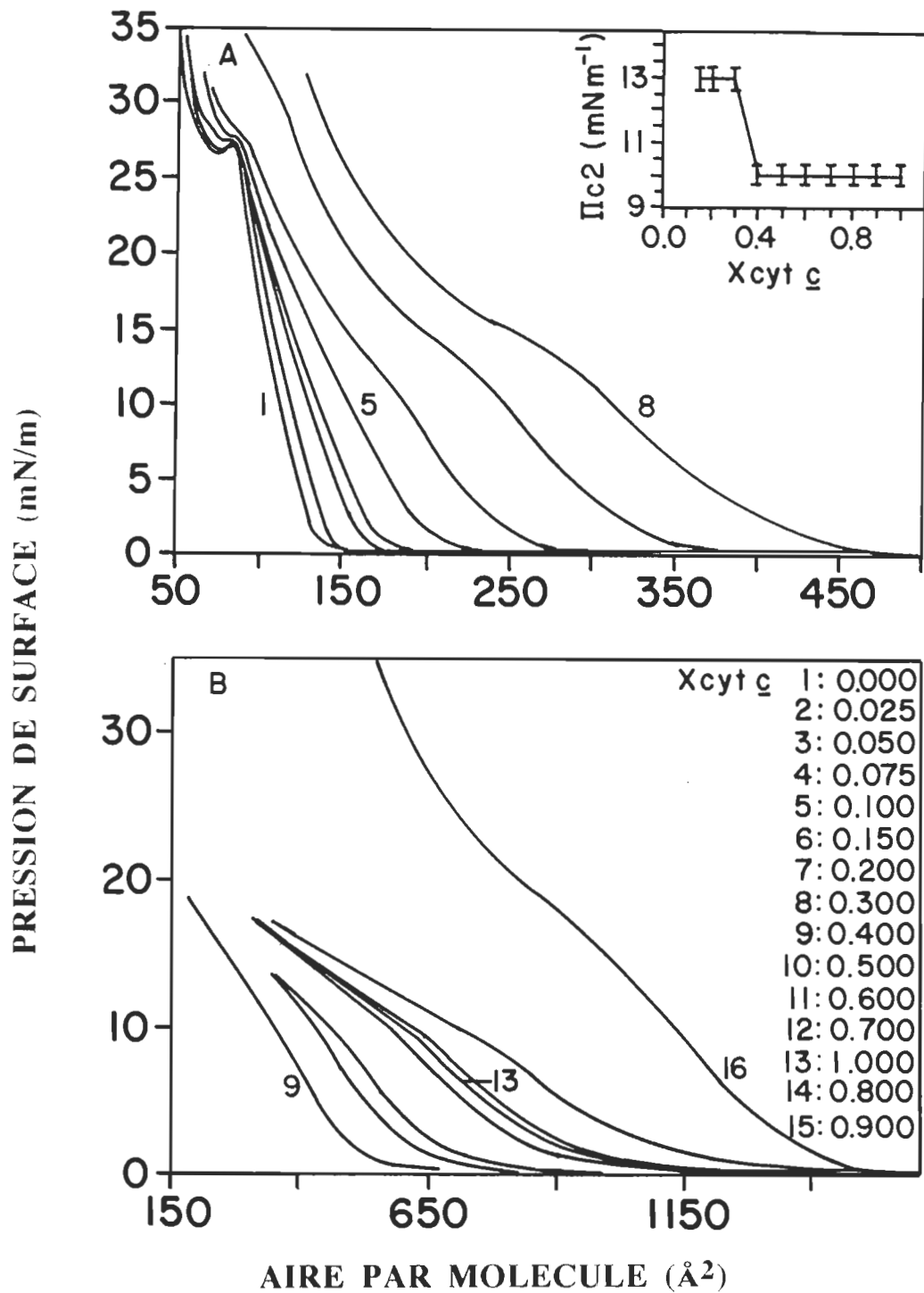


Fig. 45. Isothermes Π -A (A: 1 à 8 et B: 9 à 16) de la Chl *a*, du cyt *c* et de leurs mélanges aux fractions molaires indiquées de cyt *c*. La courbe 16 représente celle du complexe préparé en solution (voir détails dans le texte). À l'intérieur de la partie A: la variation du collapse Π_{c2} en fonction de la fraction molaire X du cyt *c*.

$$n = \frac{A_c^\Pi - A_p^\Pi}{A_a^\Pi} \quad (10)$$

À la même pression de surface Π , A_c^Π est l'aire par molécule de cyt *c* dans le mélange, A_p^Π , l'aire par molécule de cyt *c* à l'état pur et A_a^Π est l'aire par molécule de Chl *a* pure (Fig. 45). En utilisant l'équation 10 et les résultats représentés dans la figure 45, nous avons obtenu une stoechiométrie de 4:1 pour le complexe Chl *a* -cyt *c*.

Avant d'aborder l'étude des mélanges Chl *a*- cyt *c*, mentionnons que la présence d'éthanol dans la solution de cyt *c* qu'on répand sur la monocouche de Chl *a* peut soulever le problème de cristallisation de cette dernière. Afin de vérifier ce phénomène, nous avons procédé à deux tests: (i) après avoir répandu les molécules dans la solution benzénique de Chl *a* et attendu comme d'habitude pour l'évaporation du solvant, nous avons ajouté par-dessus, à divers points de la monocouche, 100 μ l de solvant du cyt *c*. Après évaporation de ce dernier, la monocouche comprimée jusqu'au collapse, a donné des isothermes Π -A et ΔV -A, identique à l'erreur expérimentale près, à celles de la Chl *a* représentées dans la figure 45. La formation de cristaux de Chl *a* aurait décalé les isothermes Π -A et ΔV -A vers les plus faibles aires moléculaires. (ii) Parallèlement au premier test, nous avons amorcé la même expérience à la surface d'une cuve de Langmuir équipée d'un spectrophotomètre à l'interface air/eau. Les détails de cet appareil mis au point dans notre laboratoire figurent dans le travail de maîtrise de Cherid (1992). L'objectif visé par ce test est de savoir s'il existe ou non des oligomères de Chl *a* à l'interface air/eau. Le spectre obtenu (non montré) est identique au spectre d'absorption des oligomères de Chl *a* rapporté par Cherid (1992), soit deux

bandes majeures situées à 440 et 680 nm, et prouve que la méthode utilisée dans notre travail, préserve les propriétés oligomériques de la Chl *a* au sein des mélanges Chl *a*- cyt *c*.

Les isothermes Π -A obtenues pour les mélanges Chl *a*- cyt *c* à différentes fractions molaires de cyt *c* comprises entre 0 et 1 sont montrées dans la figure 45. Comme on peut le remarquer, aux fractions molaires de cyt *c* inférieures ou égales à 0.1, l'isotherme Π -A montre un seul collapse (Π_{c1}) correspondant à celui de la Chl *a*. Lorsque la fraction molaire de cyt *c* excède 0.15, un second collapse (Π_{c2}) apparaît à une pression de surface approximative de 13 mN/m dont la valeur décroît jusqu'à celle du collapse de la protéine pure lorsque la fraction molaire du cyt *c* atteint 0.4 (Fig. 45). Rappelons que l'existence de deux collapses dans l'isotherme du mélange, est associée à l'immiscibilité des deux constituants, chaque collapse étant lié à l'éjection des molécules d'un constituant (Gaines, 1966; Gabrielli *et al.*, 1981; Fidelio *et al.*, 1987). Dès son apparition dans l'isotherme du mélange, le second collapse a sa valeur maximale de 13 mN/m qui est approximativement 30 % supérieure à celle de la pression au collapse du cyt *c* pure. Cette augmentation de la valeur de la pression au collapse subie par la protéine dans le mélange, a été expliquée d'une part, par une augmentation de la stabilité de la protéine en présence du lipide, et d'autre part, par la formation d'un complexe lipide-protéine non miscible avec la phase protéique dominante (Fidelio *et al.*, 1986; 1987). Maintenues à basse pression de surface, les protéines en monocouche sont soumises au phénomène de dépliement, conduisant ainsi à leur dénaturation (Verger et Pattus, 1982). Afin de vérifier ceci dans le cas des mélanges Chl *a*- cyt *c*, nous avons maintenu pendant deux heures à une pression de 0 mN/m, les monocouches mixtes dont la fraction molaire de cyt *c* est de 0.05, 0.10 et

0.20. Les résultats représentés dans la figure 46 montrent un élargissement de l'aire moléculaire, et une élévation de la pression au collapse Π_{c2} dont la valeur passe de 13 à 16.5 mN/m. En outre, ces modifications observées uniquement pour les mélanges dont la fraction molaire de cyt *c* est supérieure à la valeur critique de 0.1, s'ajoute celle de la disparition du

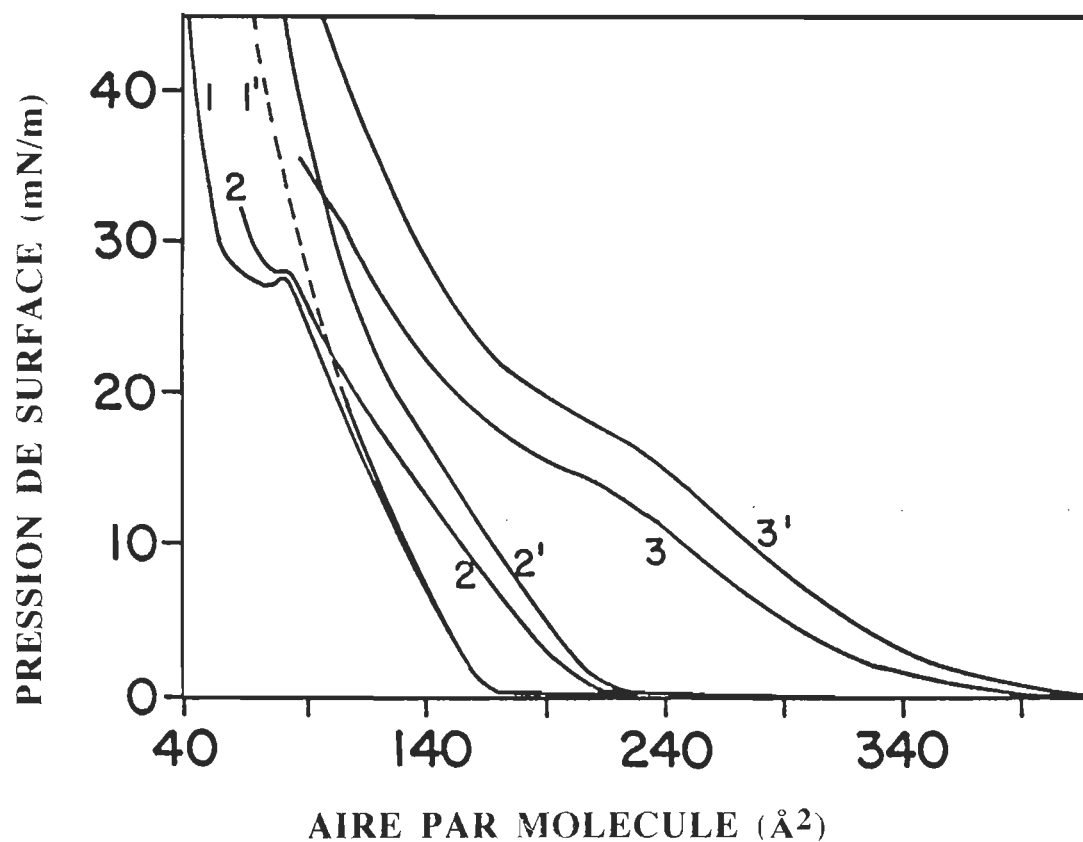


Fig. 46. Isothermes Π -A des mélanges Chl *a* -cyt *c* aux fractions molaires suivantes de cyt *c* : 0.05 (courbe 1), 0.10 (courbe 2), et 0.20 (courbe 3). 1'-3' représentent les isothermes des mêmes monocouches comprimées 2 heures après leur épandage.

collapse Π_{c1} associé à l'éjection des molécules de la Chl *a* de la monocouche. Ces observations suggèrent deux interprétations: (i) l'accroissement de l'aire moléculaire et l'élévation de la valeur de Π_{c2} qui sont une indication d'un changement conformationnel du cyt *c* dans la monocouche mixte, résultant d'un dépliement de la molécule qui serait

favorisé par l'augmentation du rapport résidus hydrophobes/résidus hydrophiles et qui conduirait à sa dénaturation à l'interface air eau. (ii) Apparemment, dans le mélange, le cyt *c* est plus susceptible d'être dénaturé lorsque sa fraction molaire dépasse le seuil critique de 0.1. L'hypothèse de la dénaturation du cyt *c* lorsqu'il est représenté à grande concentration est également appuyée par l'observation aux grandes pressions de surface (plus grande que le collapse de la Chl *a*) d'un film insoluble coagulé. Cette coagulation que nous avons observée dans les monocouches de cyt *c* et *f* dénaturés par l'effet de NaCl (voir chap. 3. 2), est également rapportée dans les monocouches de protéines pures (MacRitchie, 1986) ou de mélange pigment-protéine (Lamarche *et al.*, 1988b) comprimées à des pressions de surface élevées. Lorsque la fraction molaire du cyt *c* dépasse 0.4, la protéine occupe à elle seule plus de 80 % de la surface totale du mélange, ce qui donne à la monocouche des propriétés interfaciales principalement dominées par celles du cyt *c*, dont la valeur du collapse (Fig. 45).

L'application de la règle d'additivité de l'aire moléculaire (équation 1) aux mélanges Chl *a*-cyt *c* issus de la figure 45 montre que les points expérimentaux ne sont pas conformes aux mélanges idéaux prévus par la règle, et ce pour toute la gamme de fractions molaires étudiées. Les résultats représentés dans la figure 47 montrent que les mélanges dont la fraction molaire de cyt *c* est inférieure ou égale 0.1, sont décalés négativement, alors que ceux dont la fraction molaire est supérieure à 0.15, sont décalés positivement par rapport à la règle d'additivité. Ces résultats confirment la miscibilité et l'existence d'une forte interaction entre les molécules des deux constituants mélangés à des fraction molaires de cyt *c* comprises entre 0 et 0.1. Aux fractions molaires supérieures à 0.10, l'expansion de l'aire moléculaire observée dans la figure 47 suggère deux

explications: (i) d'une part, l'immiscibilité des deux constituants; (ii) et d'autre part, la dénaturation de la protéine excessivement représentée dans le film. Cette dénaturation se ferait par une éventuelle expansion de la conformation de la molécule. Ce dernier point est justifié par l'observation suivante: si on avait représenté dans la figure 47 les points expérimentaux issus des isothermes Π -A 1' à 3' de la figure 46, on aurait observé un plus grand décalage positif par rapport à la règle d'additivité.

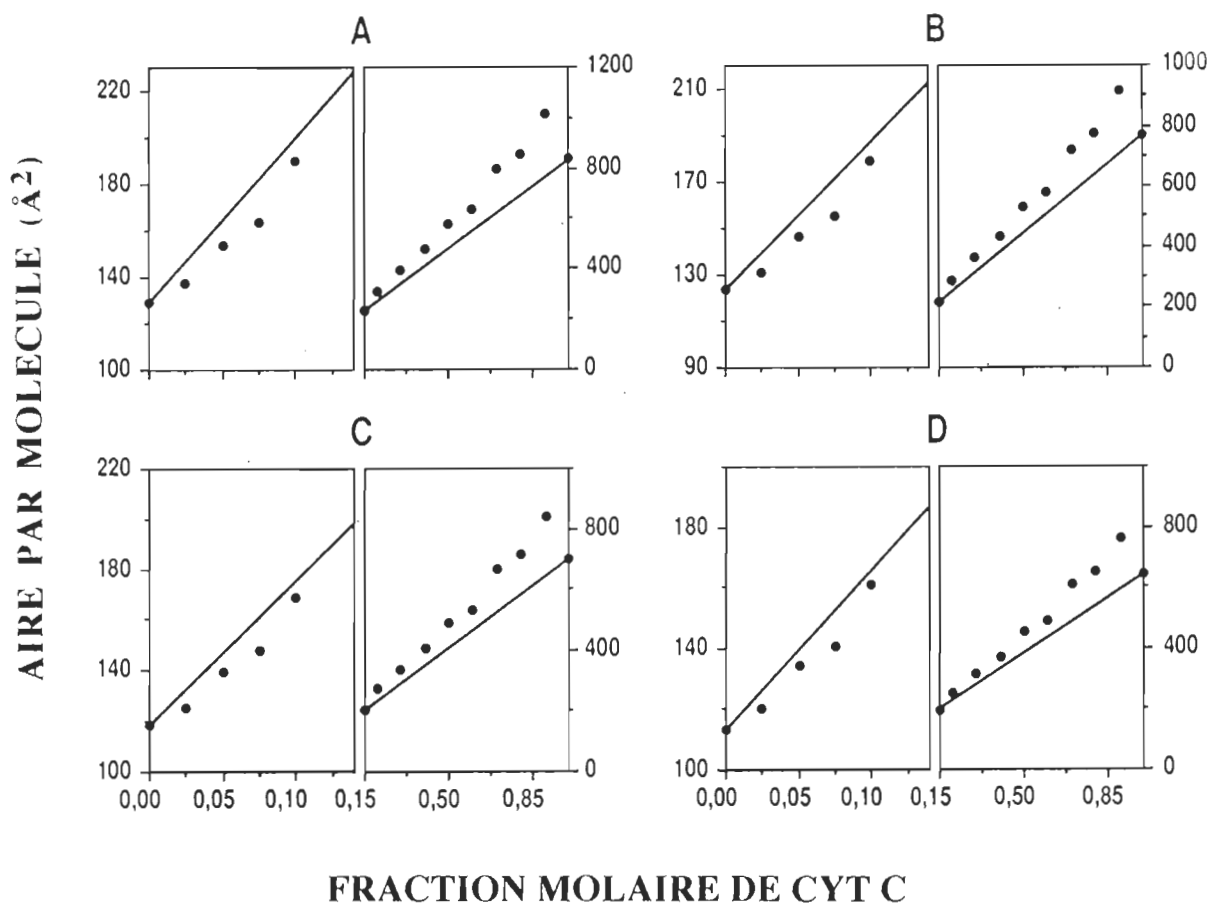


Fig. 47. L'aire moléculaire représentée en fonction de la fraction molaire de la protéine pour le système cyt *c*-Chl *a*. Les valeurs sont déduites graphiquement de la Figure 45 aux pressions de surface de: 3 mN/m (A), 5 mN/m (B), 7 mN/m (C) et 9 mN/m (D). La droite et les points noirs représentent les valeurs calculées -par la règle d'additivité (équation 1)- et les valeurs expérimentales respectivement.

Pour mieux caractériser la miscibilité et comprendre la thermodynamique de l'interaction entre les deux constituants, nous avons évalué l'énergie libre en excès des mélanges (équation 2). Cette quantité est interprétée d'une part, comme l'énergie d'interaction entre les deux constituants à une pression de surface donnée, et d'autre part, comme un critère complémentaire pour l'indication de la miscibilité. Les résultats présentés dans la figure 48 montrent des valeurs négatives de $\Delta G_m^{E,\Pi}$ pour les fractions molaires de cyt *c* inférieure ou égale à 0.1, ce qui confirme ainsi la miscibilité et l'existence d'une forte interaction entre les molécules

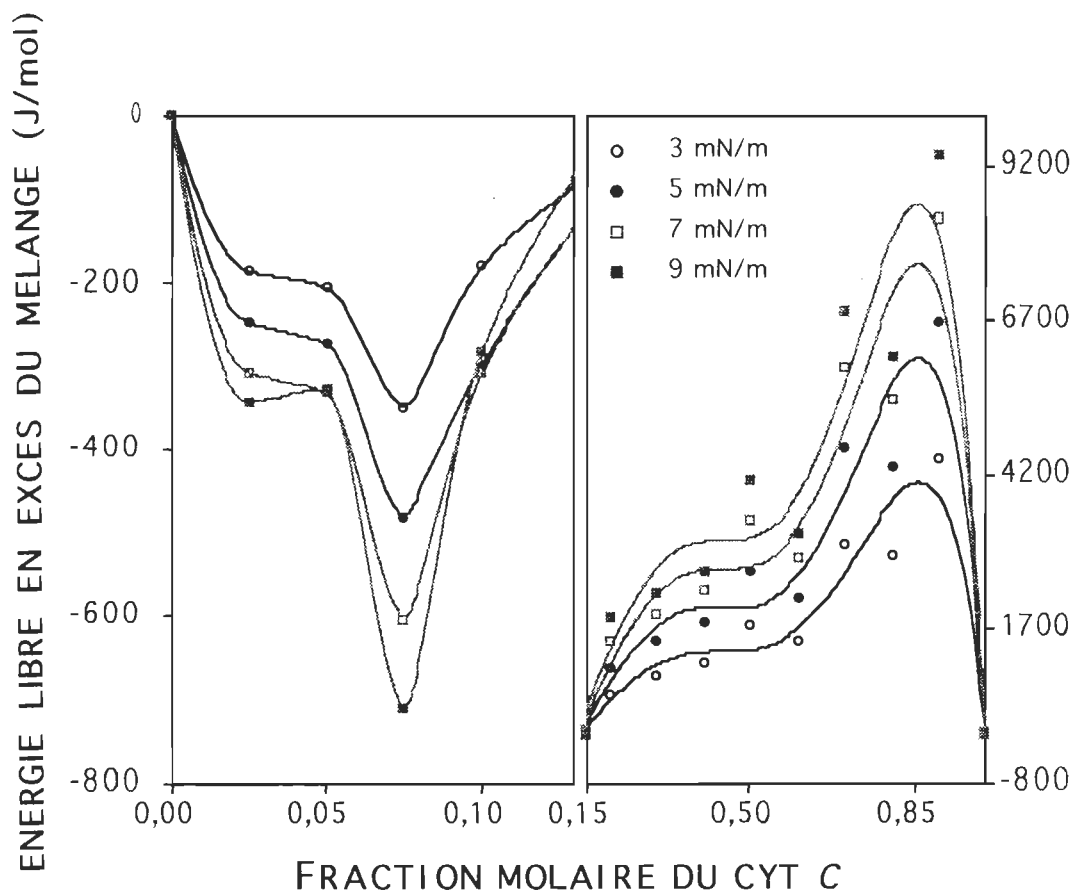


Fig. 48. L'énergie libre en excès du mélange représentée en fonction de la fraction molaire du cyt *c* pour le système cyt *c* -Chl *a*. Les pressions de surface sont indiquées dans la figure.

des deux constituants. Par contre, des valeurs positives de $\Delta G_m^{E,\Pi}$ sont observées pour toute la gamme de fractions molaires de cyt *c* supérieures à 0.15. Puisqu'à partir de cette fraction molaire, les isothermes des mélanges montrent deux collapses bien définis, les valeurs de $\Delta G_m^{E,\Pi}$ de plus en plus positives au fur à mesure que la concentration de cyt *c* augmente dans la monocouche, soutiennent l'hypothèse de la formation de domaines protéiques à côté des complexes pigment-protéine. L'hypothèse de séparation de phases est de plus en plus plausible du fait que, dans le cas du cyt *c* pure, aussi bien que dans les cas de complexes cyt *c*-lipide étudiés ci-dessus, l'excès de protéine mis de côté par la séparation de phases est éjecté de la monocouche après plus d'un cycle compression-expansion à des grandes pressions de surface. Cette interprétation nous paraît justifiée contrairement à celle de la formation d'un complexe lipide-protéine plus stable tel que suggéré pour ce type d'isothermes par d'autres chercheurs (Verger et Pattus, 1982; Fidelio *et al.*, 1987).

3. 2. 3. 3. 2. 2. Spectres FTIR

Les spectres FTIR de nombreuses protéines en solution aqueuse ont été rapportés et les bandes caractérisant différentes conformations de protéine ont été identifiées (Surewicz et Mantch, 1988). Les spectres obtenus pour la Chl *a*, le cyt *c*, et les mélanges Chl *a* -cyt *c* de 10 et 30 % en mole de cyt *c* sont représentés dans la figure 49. Dans tous les cas, les spectres sont pris sur une monocouche déposée par la technique LB sur une pastille de silicium à une pression de surface de 7.5 mN/m. Le spectre FTIR obtenu pour le cyt *c* pur est similaire à celui rapporté pour cette protéine à l'état solide et en solution aqueuse (Yang *et al.*, 1985; Byler et Susi, 1986). Il en est de même pour celui de la Chl *a* dont le spectre est similaire à ceux

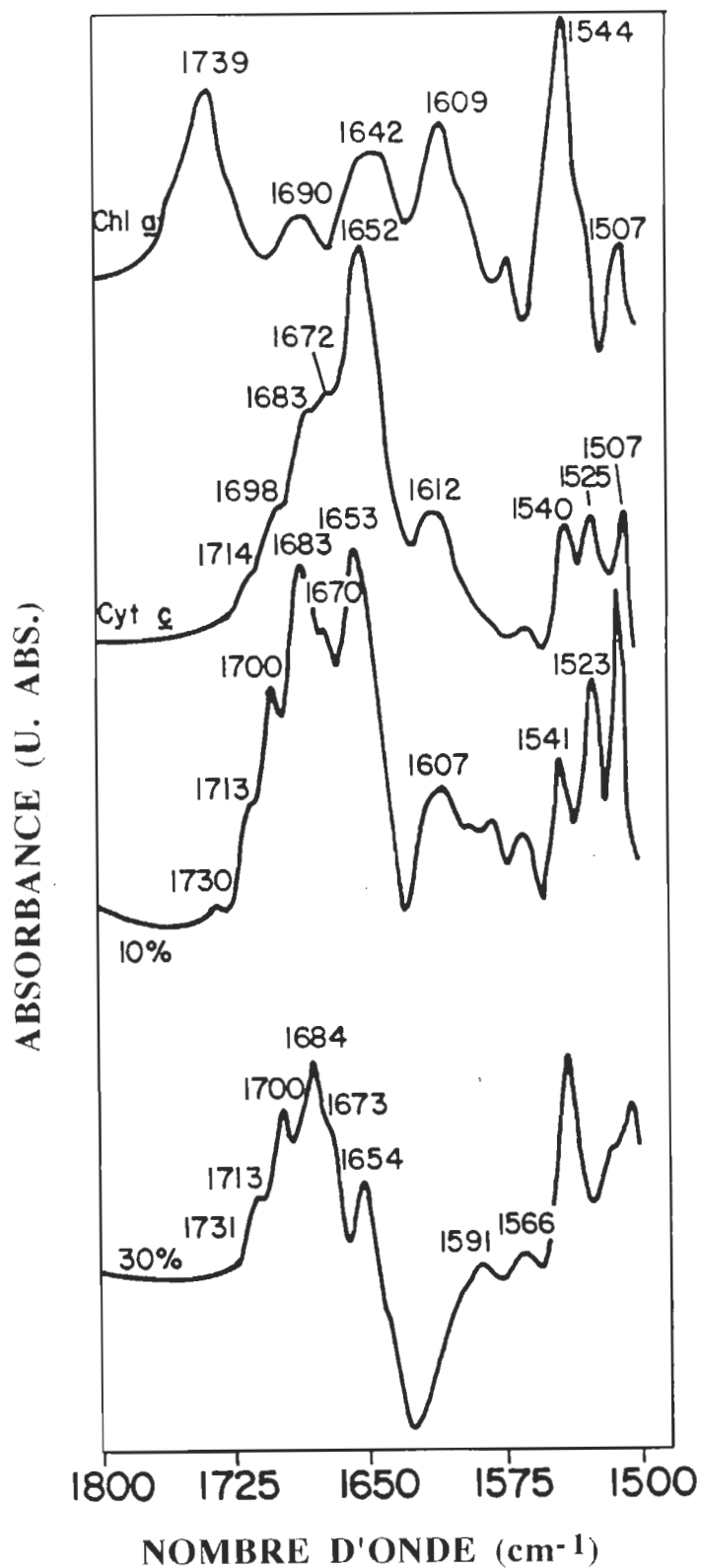


Fig. 49. Spectres FTIR de la Chl *a*, du cyt *c* et des mélanges cyt *c* -Chl *a* aux pourcentages molaires de cyt *c* indiqués. Chaque spectre est pris pour un film LB déposé à une pression de surface de 7.5 mN/m sur une pastille de silice.

rapportés antérieurement (Chapados *et al.*, 1980; Chapados et Leblanc, 1983; Bardwell et Dignam, 1987). Les spectres de protéine dans l'eau sont principalement caractérisés par deux bandes importantes d'absorption, une centrée entre 1700 et 1600 cm^{-1} (bande amide I) et une autre entre 1600 et 1500 cm^{-1} (bande amide II) (Holloway et Mantsch, 1989; Dong *et al.*, 1990). Ces deux bandes sont constituées de plusieurs bandes secondaires caractérisant chacune une structure secondaire spécifique de la protéine (Holloway et Mantsch, 1989). Dans le spectre FTIR du cyt *c*, l'importante bande d'absorption à 1652 cm^{-1} dans la zone amide I est attribuée au mode d'étirement du C=O de la protéine, dans une structure en hélice- α (Fig. 49). Ceci correspond à une conformation de cyt *c* dans laquelle la structure en hélice- α est prédominante (Dong *et al.*, 1990). De plus, la présence de nombreuses bandes secondaires absorbant à 1612, 1672, 1683 et 1698 cm^{-1} , peut être associée à l'existence de petites quantités de structures- β (Byler et Susi, 1986; Surewicz et Mantsh, 1988). Dans le film LB de Chl *a*, on détecte également plusieurs bandes dans la région 1740-1600 cm^{-1} qui peuvent être attribuées aux vibrations d'étirement de l'ester C=O, du C=O libre, et du métal coordonné C=O (Chapados *et al.*, 1980; Chapados et Leblanc, 1983). Lorsque le cyt *c* est mélangé à une fraction molaire de 0.1 à la Chl *a*, des changements marqués relativement aux spectres FTIR du cyt *c* apparaissent dans le spectre du mélange. Parallèlement à l'augmentation de la fraction molaire du cyt *c* de 10 à 30 %, la bande amide I de la protéine à 1652 cm^{-1} perd de son intensité, tandis qu'une nouvelle et forte bande absorbant à 1684 cm^{-1} apparaît dans les spectres. Particulièrement à 30 % de mole de cyt *c*, la bande à 1652 cm^{-1} perd beaucoup de son intensité, tandis que celle à 1684 cm^{-1} apparaît comme la principale bande qui caractérise le spectre (Fig. 49). Ces changements spectraux observés dans la région amide I du spectre FTIR du cyt *c*

indiquent des modifications structurales de la protéine au sein du mélange, qui peuvent être interprétées en terme d'une augmentation des structures- β aux dépens de l'hélice- α . Un phénomène similaire observé dans les spectres de protéines dénaturées par un gradient de pH ou par la chaleur a été rapporté par d'autres chercheurs (Parker, 1983; Surewicz *et al.*, 1987).

Des études sur l'interaction lipide-protéine dans les bicouches et liposomes ont montré qu'à la suite de leur complexation avec les lipides, plusieurs peptides biologiquement actifs (Kaiser et Kézdi, 1987; Demel *et al.*, 1990) ainsi que plusieurs protéines (Surewicz *et al.*, 1987; de Jongh et de Kruijff, 1990) subissent des changements conformationnels importants allant de structures désordonnées à des structures ordonnées principalement en hélices- α . Ce comportement confirme la forme en hélice- α de la conformation trans-membranaire des protéines. Par ailleurs, d'autres études sur la dénaturation des protéines dans un milieu acide ou par les fortes températures ont montré que celles-ci manifestent dans ces conditions des changements conformationnels marqués de structures en hélices- α à des structures principalement de type β (Parker, 1983; Surewicz *et al.*, 1987). Une situation analogue est observée dans la présente étude dans les mélanges Chl *a* -cyt *c* dont la fraction molaire de cyt *c* dépasse 0.1 où le spectre FTIR est principalement caractérisé par les bandes attribuées aux structures- β (Fig. 49). Puisque les structures- β permettent des interactions hydrophobes (Shibata *et al.*, 1985), le grand décalage positif par rapport à la règle d'additivité observé dans le cas des mélanges à forte concentration de cyt *c*, pourrait être causé par l'agrégation des molécules de cyt *c*. La bande à 1739 cm^{-1} observée dans le spectre FTIR de la Chl *a* et qui est reliée au groupement ester, est décalée dans le spectre de mélange avec une perte d'intensité, à approximativement 1730 cm^{-1} . Cela indique que la

complexation du *cyt c* avec la *Chl a* favorise la participation du groupement carbonyle dans un réseau important de liens hydrogène. Ces changements peuvent aussi être attribués à l'interaction des groupements carbonyles dans une coordination $C=O \dots \text{métal}$ et dans la formation d'espèces agrégées. Dans le spectre de *Chl a*, la bande à 1690 cm^{-1} attribuée au groupement carbonyle, est décalée à 1700 cm^{-1} dans le spectre du mélange, tandis que celle à 1642 cm^{-1} , la bande principale qui caractérise l'agrégation de la *Chl a*, est recouverte par l'importante bande amide I du *cyt c* absorbant à 1654 cm^{-1} . D'autres bandes dans les spectres de la *Chl a* et du *cyt c* absorbant avec une intensité moyenne à 1609 et 1612 cm^{-1} respectivement, sont recouvertes par celles du complexe *Chl a* - *cyt c*. Puisque ces changements observés dans les spectres infrarouges sont principalement associés aux groupements carbonyles de la *Chl a* et de la protéine, il est évident que la participation des groupements cétones est très importante dans la complexation *Chl a* - *cyt c*. Cette formation de complexes peut se produire, soit par la participation des groupements cétone et de la coordination de l'atome magnésium de la *Chl a*, soit directement par liaison-H des groupements polaires de la protéine et du pigment. Il est important de noter que les molécules d'eau peuvent aussi être impliquées dans cette interaction *Chl a* - *cyt c*.

En conclusion, les résultats présentés pour l'étude du système *Chl a* - *cyt c* peuvent aider à comprendre le type d'interaction existant dans les complexes *Chl*-protéine dans la membrane du thylacoïde et particulièrement dans les photosystèmes. Ainsi, la reconstitution de tels systèmes biologiques doit tenir compte de la composition en protéine pour laquelle le système est fonctionnel. Cette composition déterminée en pourcentage de *cyt c* et pour laquelle le système étudié montre la meilleure miscibilité et

une interaction importante est d'environ 7 %. Au-delà de la stoechiométrie du mélange Chl *a*-cyt *c* de 9:1, le système semble exister en phases séparées où la protéine adopte une conformation dépliée. Une stoechiométrie similaire est déduite à partir d'une autre étude rapportée par Lamarche *et al.* (1988b). Dans ce travail, le cyt *c* est incorporé à la monocouche de Chl *a* à partir de la sous-phase où il est injecté, contribuant ainsi à l'augmentation de l'aire moléculaire du mélange. Cependant, dans le cas du complexe formé en solution, le faible rapport Chl *a*/cyt *c* de 4:1, pourrait être dû à une différence dans les conditions environnementales comme l'agrégation et/ou la microcristallisation de la Chl *a* mise en solution partiellement aqueuse. La centrifugation a certainement été efficace pour l'élimination des microcristaux avant l'addition de l'éthanol, mais probablement pas pour la totalité des oligomères, ce qui a donné une sous-estimation de l'aire occupée par les molécules de Chl *a*. En se basant sur les résultats des spectres FTIR, nous avons observé un changement conformationnel du cyt *c* avec une apparition de structures principalement de type β , aux dépens des hélices α dont l'importance décroît. En outre, les spectres FTIR ont mis en évidence d'une part l'implication des groupements cétones dans la complexation de la Chl *a* avec le cyt *c*, et d'autre part un changement conformationnel de la protéine.

4. Conclusion

À la lumière des résultats présentés dans le cadre de l'interaction lipide-lipide, on conclut que la PQ9 forme une monocouche stable à l'interface air/eau. En outre, en mélange avec la chl *a*, celle-ci donne des monocouches miscibles et elle est capable de soutenir des pressions latérales relativement élevées et comparables à celle rapportée (20 à 30 mN/m) pour les membranes biologiques (Fidelio *et al.*, 1986; Birdi, 1989) et ce, seulement si sa fraction molaire est faible (0.1). Cette faible fraction molaire est comparable à celle généralement rapportée pour les tissus photosynthétiques (0.1-0.2 mol/mol de chlorophylle) (Grumbach, 1983; Hooper, 1984). Ainsi, en tenant compte de la nature de ces conditions similaires à celles rencontrées dans les membranes biologiques, comme la fraction molaire et la pression latérale, nos résultats indiquent que la PQ9 et la chl *a* peuvent interagir dans la bicouche thylacoïdale tel que discuté ci-dessus. Par contre, ces résultats ne sont pas en accord avec ceux d'autres chercheurs montrant que la PQ9 est prise en "sandwich" dans la partie hydrophobe de la bicouche (Robert et Tancrède, 1991).

Les propriétés interfaciales des cyt *f* et *c* déterminées dans ce travail ont montré que les deux protéines forment une monocouche stable à l'interface air/eau. Une comparaison entre la section du cyt *c* connue par diffraction des rayons X et son aire moléculaire déterminée en monocouche, a montré par l'excellente analogie dans les deux cas que la molécule aurait gardé sa structure native à l'interface air/eau. Les courbes de compression des deux molécules sont hautement influencées par la concentration interfaciale initiale choisie. Pour chaque protéine, il existe une concentration critique (environ 0.5 mg/m²) au dessus de laquelle, une partie des molécules déposées est solubilisée dans la sous-phase. Les

cycles compression-expansion ont montré que le *cyt f* a une conformation plus compacte et moins sensible à la désorption et à la dénaturation que le *cyt c*. L'ajout de sel à grande concentration dans la sous-phase a causé à la protéine des changements conformationnels intenses manifestés par l'augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse, conduisant ainsi à sa dénaturation. De plus, l'effet du sel, les cycles compression-expansion, ainsi que le maintien de la protéine pendant une longue durée à 0 mN/m, nous ont permis de déterminer les symptômes qui indiqueraient la dénaturation de la protéine à l'interface air/eau.

Les résultats présentés dans le cadre de l'interaction lipide-protéine ont principalement suggéré deux interprétations: (i) la miscibilité et l'interaction entre les deux constituants pour une concentration critique de la protéine dans le mélange, et (ii) la dénaturation de la protéine dans le mélange lorsque cette concentration critique est dépassée. En utilisant plusieurs phospholipides, chargés et neutres, et deux lipides membranaires (*chl a* et MGDG), nous avons constaté que le seuil de miscibilité du *cyt c* augmente avec la fluidité du lipide ainsi qu'avec la charge et la complexité de sa tête polaire (tableau 8). En outre, dépassant ce seuil de miscibilité, les deux constituants coexistent dans le mélange en phases séparées, et la protéine

Tableau 8. Variation du seuil de miscibilité du *cyt c* avec l'état physique et la complexité de la tête polaire de divers lipides.

Lipide	DSPC	DOPC	DOPS ⁻	DOPS ⁰	MGDG	<i>chl a</i>
Seuil de miscibilité (mole <i>cyt c</i>)	0.005	0.01	0.06-0.1	0.02	0.02	0.1
État physique du lipide	Gel	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide

semble adopter une conformation dépliée. Cette forme de dénaturation de la protéine est bien mise en évidence dans le cas des mélanges chl *a* -cyt *c*, notamment par l'utilisation de la technique de FTIR. Par conséquent, afin d'éviter de travailler avec une protéine dénaturée, l'interaction lipide-protéine doit tenir compte de la conformation native de la protéine. En se basant sur les résultats des spectres FTIR, nous observons l'importance de l'implication des groupements cétones dans la complexation de la chl *a* avec le cyt *c*.

En terme de perspective, afin de mieux cerner le phénomène du changement conformationnel de la protéine, de l'état natif à l'état dénaturé, nous proposons une étude par la technique de FTIR à l'interface air/eau. Ainsi, puisque cette technique est plus pertinente que d'autres, elle éviterait de travailler avec une protéine dénaturée dans les modèles qui simulent les systèmes biologiquement actifs. Par ailleurs, nous proposons l'application de cette technique aux mélanges lipide-protéine en utilisant les lipides et les protéines membranaires. Cela permettra de sonder *in situ* la conformation que peut adopter la protéine au sein de la monocouche aux fractions molaires pour lesquelles les constituants sont miscibles ou non miscibles comme nous l'avons démontré dans notre étude.

5. Références

- Adam Z., et Malkin R. (1989) On the interaction between cytochrome *f* and plastocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 158-163.
- Aghion J., Broyde S. B., et Brody S. S. (1969) Surface reactions of chlorophyll *a* monolayers at a water-air interface. Photochemistry and complex formation. *Biochemistry* 8: 3120-3125.
- Allred D. R., et Staehelin L. A. (1986) Implications of cytochrome *b₆/f* location for thylacoid electron transport. *J Bioenerg. Biomembranes* 18: 419-436.
- Almog R., Marsilio F. et Berns D. (1988) Interaction of C-phycoerythrin with lipid monolayers under nitrogen and in the presence of air. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 28-36.
- Amesz J. (1973) The function of plastoquinone in photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 301: 35-51.
- Anderson J. M. (1975) The molecular organization of chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* 416: 191-235.
- Arnon D. I., et Tang G. M.-S. (1986) Inhibition by plastoquinone analogues of ferricyanide reduction by a photosystem II chloroplast preparation. *Biochim. Biophys. Acta* 849: 347-354.
- Bardwell J. A., et Dignam M. (1987) Infrared-spectra of Langmuir-Blodgett chlorophyll-*a* films resolved into normal and tangential components. *J. Colloid Interface Sci.* 116: 1-7.
- Batenburg A. M., Demel R. A., Verkleij A. J., et de Kruijff B. (1988) Penetration of the signal sequence of *Escherichia coli* PhoE protein into phospholipid model membranes leads to lipid-specific changes in signal peptide structure and alterations of lipid organization. *Biochemistry* 27: 5678-5685.

- Bialek-byłka G. E., et Wrobel D. (1986) Temperature-induced spectral properties of chlorophyll *a* incorporated into egg-yolk lecithin liposomes and lipo-protein complexes. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 21: 369-379.
- Birdi K. S. (1989) *Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces*. Plenum Press, New York. 325 p.
- Bishop D. G., Kenrick J. R., Bayston J. H., Macpherson A. S., et Johns S. R. (1980) Monolayer properties of chloroplast lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 602: 248-259.
- Byler M., et Susi H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25: 469-487.
- Chapados C., Germain D., et Leblanc R. M. (1980) Aggregation of chlorophylls in monolayers. Part IV. The reorganization of chlorophyll *a* in multilayer array. *Biophys. Chem.* 12: 189-198.
- Chapados C., et Leblanc R. M. (1983) Aggregation of chlorophylls in monolayers. V. The effect of water on chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in mono- and multilayer array. *Biophys. Chem.* 17: 211-244.
- Cherid N-E. (1992) Mise au point d'un système de mesure pour étudier les propriétés d'absorption et de fluorescence à l'interface air/eau. Mémoire de maîtrise ès-sciences. Université du Québec à Trois-Rivières.
- Chin P., et Brody S. S. (1975) Surface properties of monomolecular films of oxidized and reduced cytochrome *c* and *f*. *Biochemistry* 14: 1190-1193.
- Chin P., et Brody S. S. (1976) Mixed monomolecular films of chlorophyll and cytochromes. *Z. Naturforsch.* 31C: 44-47.

- Cornell D. J., et Carroll R. J. (1985) Miscibility in lipid-protein monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 108: 226-233.
- Crisp D. J. (1949) Dans: *Surface chemistry. Supplement to Research.* London. p: 17-23.
- Danielli J. F., et Davson H. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.* 5: 495-508.
- Darnell J., Lodish H., et Baltimore D. (1988) *La Cellule. Biologie Moléculaire.* Editions Vigot, Paris.
- Davies R. J., Goodwin G. C., Lyle I. G., et Jones M. N. (1983) The behaviour of glycophorin at the air-water interface. *Colloid & Surfaces* 8: 29-43.
- Davies R. J., Goodwin G. C., Lyle I. G., et Jones M. N. (1984) The interaction of glycophorin with dipalmitoylphosphatidylcholine at the air-water interface. *Colloid & Surfaces* 8: 261-270.
- De Costa S. M. de B., Froines J. R., Harris J. M., Leblanc R. M., Orger B. H., et Porter G. (1972) Model systems for photosynthesis. III. Primary photoprocesses of chloroplast pigments in monomolecular arrays on solid surfaces. *Proc. Roy. Soc. Lond. A.* 326: 503-519.
- De Feijer J. A., et Benjamins J. (1987) Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface. Dans: Dickinson E. (Ed) *Food emulsions and foams*, Vol. 58, p: 72-85. Pub. Royal Soc. Chem., Burlington House, London, U. K.
- de Jongh H. H. J., et de Kruijff, B. (1990) The conformational changes of apocytochrome *c* upon binding to phospholipid vesicles and micelles of phospholipid based detergents: a circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta* 1029: 105-112.

- Demel R. A., Paltauf F., et Hauser H. (1987) Monolayer characteristics and thermal behavior of natural and synthetic phosphatidylserines. *Biochemistry* 26: 8659-8665.
- Demel R. A., Goormaghtigh, E., et de Kruijff, B. (1990) Lipid and peptide specificities in signal peptide-lipid interactions in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1027: 155-162.
- Demel R. A., Schiavo G., de Kruijff B., et Montecucco C. (1991) Lipid interaction of diphtheria toxin and mutants. A study with phospholipid and protein monolayers. *Eur. J. Biochem.* 197: 481-486.
- de Vrije T., de Swart R. L., Dowhan W., Tommassen J., et de Kruijff B. (1988) Phosphatidylglycerol is involved in protein translocation across *Escherichia coli* inner membranes. *Nature* 334: 173-175.
- Dong A., Huang P., et Caughey W. S. (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29: 3303-3308.
- Ducharme D. (1987) Construction, mise au point d'un ellipsomètre et études ellipsométriques de phospholipides à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada.
- Es-Sounni A. et Leblanc R. M. (1992) Mixed monolayer studies of chlorophyll *a* and plastoquinone 9 at the nitrogen-water interface. *Langmuir* 8: 1578-1581.
- Es-Sounni A., Gruszecki W. I., Tajmir-Riahi H-A., Zelent B., Wang G., et Leblanc R. M. (1993) Complexation of chlorophyll *a* and cytochrome *c* in monolayer at the air-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* (Soumis).
- Fidelio G. D., Maggio B., et Cumar F. A. (1984) Interaction of myelin basic protein, melittin and bovin serum albumin with gangliosides,

- sulfatide and neutral glycosphingolipids in mixed monolayers. *Chem. & Phys. of Lipids* 35: 231-245.
- Fidelio G. D., Maggio B., et Cumar F. A. (1986) Interaction of melittin with glycosphingolipids and phospholipids in mixed monolayers at different temperatures. Effect of the lipid physical state. *Biochim. Biophys. Acta* 862: 49-56.
- Fidelio G. D., Austen B. M., Chapman D., et Lucy J. A. (1987) Interactions of ovalbumin and its putative signal sequence with phospholipid monolayers. *Biochem. J.* 244: 295-301.
- Fiskum G. (1989) *Cell Calcium Metabolism. Physiology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Implications.* Plenum Press, New York.
- Gabrielli G., Baglioni P., et Maddii A. (1981) Orientation and compatibility in monolayers. 1. Macromolecular compounds and fatty acids. *J. Colloid Interface Sci.* 79: 268-271.
- Gaines, G. L. Jr. (1966). *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces.* John Wiley and Sons, Interscience, New York. 386 p.
- Gaines G. L. Jr., Tweet A. G., et Bellamy W. D. (1965) Interaction between chlorophyll *a* and vitamin K₁ in monomolecular films. *J. Chem. Phys.* 42: 2193-2199.
- Gallant J., et Leblanc R. M. (1991) Purification of galactolipids by high-performance liquid chromatography for monolayer and Langmuir-Blodgett film studies. *J. Chromatogr.* 542: 307-316.
- Gennis R. B. (1989) *Biomembranes. Molecular Structure and Function.* Springer-Verlag, New York.
- Gierasch L. M. (1989) Signal sequences. *Biochemistry* 28: 923-930.
- Gorter E., et Grendel F. (1925) On bimolecular layers of lipid on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* 41: 439-443.

- Gounaris K., and Barber J. (1983) Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in nature. *Trends in Biochem. Sci.* 8: 378-381.
- Graham D. E., et Phillips M. C. (1979a) Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *J. Colloid Interface Sci.* 70: 403-414.
- Graham D. E., et Phillips M. C. (1979b) Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms. *J Colloid Interface Sci.* 70: 415-426.
- Graham D. E., et Phillips M. C. (1979c) Proteins at liquid interfaces. III. Molecular structure of adsorbed films. *J Colloid Interface Sci.* 70: 427-439.
- Grainger D. W., Reichert A., Ringsdorf H., Salesse C., Davies D. E., et Lloyd J. B. (1990) Mixed monolayers of natural and polymeric phospholipids: Structural characterization by physical and enzymatic methods. *Biochim. Biophys. Acta* 1022: 146-154.
- Gray J. C. (1978) Purification and properties of monomeric cytochrome *f* from charlock, *Sinapsis arvensis* L. *Eur. J. Biochem.* 82: 133-141.
- Gregory D., et Ginsberg L. (1984) Calcium association with phosphatidylserine. Modification by cholesterol and phosphatidylcholine in monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 769: 238-244.
- Grumbach K. H. (1983) Distribution of chlorophylls, carotenoids and quinones in chloroplasts of higher plants. *Z. Naturforsch.* 38c: 996-1002.
- Guay D. (1986) Etude thermodynamique des systèmes moléculaires mixtes Chl *a*/ α -TQ, Chl *a*/PQ2, Chl *a*/PQ3 et Chl *a*/PQ9 à l'interface air/eau. Mémoire de maîtrise ès-sciences. Université du Québec à Trois-Rivières. 143 p.

- Guay D., et Leblanc R. M. (1987) Excess free energies of interaction of chlorophyll *a* with α -tocopherylquinone and plastoquinone 3 and 9. A mixed-monolayer study. *Langmuir* 3: 575-580.
- Hartl F-U., Lecker S., Schiebel E., Hendrick J. P., et Wickner W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 63: 269-279.
- Harwood J. L., et Stumpf P. K. (1976) Plant acyl lipids: evolutionary curiosities or functional constituents? *Trends in Biochem. Sci.* 1: 253-256.
- Hauska G. (1977) Plasto and ubiquinone as translocator of electrons and protons through membranes. A facilitation role of the isoprenoid side chain. *FEBS Lett.* 79: 345-347.
- Heckl W. M., Lösche M., Scheer H., et Möhwald H. (1985a) Protein/lipid interaction in phospholipid monolayers containing the bacterial antenna protein B800-850. *Biochim. Biophys. Acta* 810: 73-83.
- Heckl W. M., Lösche M., et Möhwald H. (1985b) Langmuir-Blodgett films containing proteins of the photosynthetic process. *Thin Solid Films* 133: 73-81.
- Heckl W. M., et Möhwald H. (1987) Cytochrome *b5* partitioning between fluid and gel phase lipid monolayer membranes. *J. Electronics* 3: 67-73.
- Heckl W. M., Zaba B. N., et Möhwald H. (1987) Interactions of cytochromes *b5* and *c* with phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 903: 166-176.
- Ho K. K., et Krogmann D. W. (1980) Cytochrome *f* from spinach and cyanobacteria. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 255: 3855-3861.

- Holloway P. W. et Mantsch H. H. (1989) Structure of cytochrome *b₅* in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 28: 931-935.
- Hoober J. K. (1984) Chloroplasts. p: 47-77. PLenum Press, New York.
- Hoshina S., et Itoh S. (1987) Characterization of photosystem I chlorophyll-protein complexes reconstituted into phosphatidylcholine liposomes. *Plant Cell Physiol.* 28: 599-609.
- Hunter J. R., Kilpatrick P. K., et Carbonell R. G. (1990) Lysozyme adsorption at the air/water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 137:462-481.
- Hurt E. C., et Hauska G. (1981) A cytochrome *f/b₆* complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 117: 591-599.
- Inamura I., Ochiai H., Toki K., Watanabe S., Hikino S., et Araki T. (1983) Preparation and properties of chlorophyll/water-soluble macromolecular complexes in water. Stabilization of chlorophyll aggregates in the water-soluble macromolecule. *Photochem. Photobiol.* 38: 37-44.
- Inamura I., Araki T., Shei M., Nishikawa T., Shibata H., et Ochiai H. (1988) Properties of the water-soluble chlorophyll-synthetic linear macromolecular complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 932: 335-344.
- Isler O. (1971) Dans: Isler O. (Ed.) Carotenoids. Birkhauser Verlag Basel. p: 11-27.
- Jiang J. X., Abrams F. S., et London E. (1991) Folding changes in membrane-inserted diphtheria toxin that may play important roles in its translocation. *Biochemistry* 30: 3857-3864.

- Kaiser E. T., et Kézdy F. J. (1987) Peptides with affinity for membranes. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 561-581.
- Kaplan S., et Arntzen C. J. (1982) Photosynthetic membrane structure and function. Dans: Govindjee (Ed) *Photosynthesis vol. 1. Energy conversion by plants and bacteria.* p: 65-151. Academic Press, New York.
- Karnovsky M. J., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Dawidowicz E. A., McIntyre D. E., et Klausner R. D. (1982) Lipid domains in membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 401: 61-75.
- Kashiwagi M. (1958) Some remarks on the spreading of protein monolayers (Dynamic studies on monolayer. I). *Bull. Chem. Soc.* 31: 176-80.
- Kashiwagi M. (1959) Surface films of physically and chemically treated ovalbumin (dynamic studies on monolayers II). *Chem. Soc. Jap.* 31: 954-956.
- Kézdy F. J. (1972) Lipid monolayers. Dans: Fox C. F., et Keith A. D. (Eds) *Membrane molecular biology* p: 123-45. Sinauer Associates Inc. Publishers Stamford, CO.
- Killian J. A., Keller R. C. A., Struyvé M., de Kroon A. I. M., Tommassen J., et de Kruijff B. (1990) Tryptophan fluorescence study on the interaction of the signal peptide of the *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE with model membranes. *Biochemistry* 29: 8131-8137.
- Kozarac A., Dhathathreyan A., et Möbius D. (1988) Interaction of insulin with lipid monolayers at the air/solution interface. *Colloids & Surfaces* 33: 11-24.
- Krawczyk S., Leblanc R. M., et Marcotte L. (1988) Visible absorption, fluorescence and thermal equilibration of electronic excitation energy

- in Langmuir-Blodgett multilayers of chlorophyll *a* at 85 and 300 K. J. Chim. Phys. 85: 1073-1078.
- Krebs K. E., Ibdah J. A., et Phillips M. C. (1988) A comparison of the surface activities of human apolipoproteins A-I and A-II at the air/water interface. Biochim. Biophys. Acta 959: 229-237.
- Krinsky N. I. (1971) Dans: Isler O. (Ed.) Carotenoids. Birkhauser Verlag Basel, p. 621-716.
- Kusters R., Dowhan W., et de Kruijff B. (1991) Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membranes. J. Biol. Chem. 266: 8659-8662.
- Lamarche F. (1988) Une approche permettant de qualifier et quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, Canada.
- Lamarche F., Max J. J., et Leblanc R. M. (1988a) Weak and strong lipid-protein interactions characterized by the monolayer technique. Dans: Ratner B. D. (Ed.) Surface characterization of biomaterials. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, Netherlands. 117-133.
- Lamarche F., Téchy F., Aghion J., et Leblanc R. M. (1988b) Surface pressure, surface potential and ellipsometric study of cytochrome *c* binding to dioleoylphosphatidylcholine monolayer at the air-water interface. Colloids & Surfaces 30: 209-222.
- Lamarche F., Picard G., Téchy F., Aghion J., et Leblanc R. M. (1990) Complex formation between chlorophyll *a* and cytochrome *c*. Surface properties at the air-water interface. Absorbance, fluorescence and fluorescence-lifetime in Langmuir-Blodgett films. Eur. J.

- Biochemistry. 197: 529-534.
- Lehninger A. L. (1975) Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function. Worth Publishers Inc., New York.
- Lenaz G. (1989) Membrane proteins. Dans: Milazzo G. et Blank M. (Eds) Bioelectrochemistry. Vol. II, Membrane Phenomena, p. 65-136, Plenum Press, New York.
- Li J. (1985) Light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein: three-dimensional structure of a reconstituted membrane lattice in negative stain. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 82: 386-390.
- Lichtenthaler H. K. (1977) Regulation of prenylquinone synthesis in higher plants. Dans: Teviniano M., Lichtenthaler H. K. (Eds) Lipids and lipid polymers in Higher Plants. p: 231-235. Springer-Verlag: New York.
- Liljenberg C., et Selstam E. (1980) Interactions of chlorophyll *a* and terpenoid alcohols with chloroplast acyl lipids in monomolecular films. Physiol. Plant. 48: 428-434.
- Lill R., Dowhan W., et Wickner W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. Cell 60: 271-280.
- Liu G., Topping T. B., et Randall L. L. (1989) Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9213-9217.
- Lundh G., Eliasson A-C., et Larsson K. (1988) Cross-linking of wheat storage protein monolayers by compression/expansion cycles at the air/water interface. J. Cereal Sci. 7: 1-9.
- MacRitchie F. (1981) Equilibria between adsorbed and displaced segments of protein monolayers. J. Colloid Interface Sci. 79: 461-464.

- MacRitchie F., et Ter-Minassian-Saraga L. (1984) Concentrated protein monolayers: desorption studies with radiolabelled bovine serum albumin. *Colloids & Surfaces* 10:53-64.
- MacRitchie F. (1986) Spread monolayers of proteins. *Adv. Colloid Interface Sci.* 25: 341-385.
- Maget-Dana R., Harnois I., et Ptak M. (1989) Interactions of the lipopeptide antifungal iturin A with lipids in mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 981: 309-314.
- Magio B., Diplock A. T., et Lucy J. A. (1977) Interaction of tocopherols and ubiquinones with monolayers of phospholipids. *Biochem. J.* 161: 111- 121.
- Mattai J., Hauser H., Demel R. A., et Shipley G. G. (1989) Interaction of metal ions with phosphatidylserine bilayer membranes: effect of hydrocarbon chain unsaturation. *Biochemistry* 28: 2322-2330.
- McCauley S. W., et Melis A. (1986) Quantitation of plastoquinone photoreduction in spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* 8: 3-16.
- Möhwald H. (1990) Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 41: 441-476.
- Moore A. L., Joy A., Tom R., Gust D., et Moore T. A. (1982) Photoprotection by carotenoids during photosynthesis: motional dependence of intermolecular energy transfer. *Science* 216: 982-984.
- Morse II P. D., et Deamer D. W. (1973) Interaction of cytochrome c with lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 298: 769-782.
- Munger G., Lorrain L., Gagné G., et Leblanc R. M. (1987). Adjustable speed and vibration-free hydraulic system for Langmuir-Blodgett films deposition. *Rev. Sci. Instrum.* 58: 285-288.

- Nicholson D. W., Köhler H., et Neupert W. (1987) Import of cytochrome *c* into mitochondria cytochrome *c* heme lyase. *Eur. J. Biochem.* 164: 147-157.
- Nishihara M., Yokota K., et Kito M. (1980) Lipid molecular species composition of the thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 617: 12-19.
- Norde W. (1986) Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* 25: 267-340.
- N'soukpoé-Kossi C. N., Siewewiesiuk J., Leblanc R. M., Bone R. A., et Landrum J. T. (1988) Linear dichroism and orientation studies of carotenoids in Langmuir-Blodgett films. *Biochim. Biophys. Acta* 940: 255-265.
- Olivéra O. N. Jr., Taylor D. M., Lewis T. J., Salvagno S., et Stirling Ch. J. M. (1989) Estimation of group dipole moments from surface potential measurements on Langmuir monolayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 85: 1009-1018.
- Omata T., et Murata N. (1980) A rapid and efficient method to prepare chlorophyll *a* and *b* from leaves. *Photochem. Photobiol.* 31: 183-185.
- Pachence J. M., et Blasie J. K. (1987) The location of cytochrome *c* on the surface of ultrathin lipid multilayer films using X-Ray diffraction. *Biophys. J.* 52: 735-747.
- Pachence J. M., et Blasie J. K. (1991) Structural investigation of the covalent and electrostatic binding of yeast cytochrome *c* to the surface of various ultrathin lipid multilayers using x-ray diffraction. *Biophys. J.* 59: 894-900.
- Pachence J. M., Fischetti R. F., et Blasie J. K. (1989) Location of the heme-Fe atoms within the profile structure of a monolayer of cytochrome *c*

- bound to the surface of an ultrathin lipid multilayer film. *Biophys. J.* 56: 327-337.
- Pachence J. M., Amador S., Maniara G., Vanderkooi J., Dutton P. L., et Blasie J. K. (1990) Orientation and lateral mobility of cytochrome *c* on the surface of ultrathin lipid multilayer films. *Biophys. J.* 58: 379-389.
- Parker F. S. (1983) Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry. Plenum Press, New York. p 550.
- Peschke J., et Möhwald H. (1987) Cytochrome *c* interaction with phospholipid monolayers and vesicles. *Colloids & Surfaces* 27: 305-323.
- Phillips M. C. (1977) The conformation and properties of proteins at liquid interfaces. *Chem. and Industry* 5 March 1977, p: 170-176.
- Phillips M. C., Ladbroke B. D., et Chapman D. (1970) Molecular interactions in mixed lecithin systems. *Biochim. Biophys. Acta* 196: 35-44.
- Phillips M. C., Evans M. T. A., et Hauser H. (1975) Interaction of proteins with phospholipid monolayers. Dans: Goddard E. D. (Éd) *Monolayers*. P: 217-230. American Chemical Society, Washington D.C.
- Phillips M. C., et Krebs K. E. (1986) Studies of apolipoproteins at the air-water interface. *Meth. Enzymol.* 128:387-403.
- Pilon M., Jordi W., De Kruijff B., et Demel R. A. (1987) Interaction of mitochondrial precursor protein apocytochrome *c* with phosphatidylserine in model membranes. A monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* 902: 207-216.

- Quinn P. J., et Dawson R. M. C. (1969a) The interaction of cytochrome *c* with monolayers of phosphatidylethanolamine. *Biochem. J.* 113: 791-803.
- Quinn P. J., et Dawson R. M. C. (1969b) Interactions of cytochrome *c* and [^{14}C]carboxymethylated cytochrome *c* with monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidic acid and cardiolipin. *Biochem. J.* 115: 65-75.
- Quinn P. J., et Dawson R. M. C. (1970) An analysis of the interaction of protein with lipid monolayers at the air/water interface. *Biochem. J.* 116: 671-680.
- Rawn J. D. (1989) *Biochemistry*. N. Patterson Publishers. Carolina Biological Supply Company. Burlington, North Carolina.
- Rawlyer A., Unitt M. D., Giroud C. H., Davies H., Maylor J-P., Harwood J. L., et Siegenthaler P-A. (1987) The transmembrane distribution of galactolipids in chloroplast thylakoids is universal in a wide variety of temperate climate plants. *Photosynth. Res.* 11: 3-13.
- Reinach P., et Brody S. S. (1972) Oxidative titration of monomolecular films of cytochrome *c*-II and of bacteriochlorophyll. *Biochemistry* 11: 92-96.
- Ringsdorf H., Schlarb B., et Venzmer J. (1988) Molecular architecture and function of polymeric oriented systems: Models for the study of organization, surface recognition, and dynamics of biomembranes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27: 113-158.
- Robert S., et Tancrède, P. (1991) The electrical and spectroscopic properties of planar asymmetrical membranes incorporating chlorophyll *a* and plastoquinone-9. Model of incorporation of chlorophyll *a* and plastoquinone-9. *Biochem. Cell Biol.* 69: 42-48.

- Rubin R. P., Weiss G. B. et Putney J. W. Jr. (1985) Calcium in Biological Systems. Plenum Press, New York.
- Saint-Pierre-Chazalet M., Billodet F., et Pileni M. P. (1989) Cytochrome *c* monolayer and mixed surfactant-cytochrome *c* monolayer. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 79:76-80.
- Satoh K., et Butler W. L. (1978) Low temperature spectral properties of subchloroplast fractions purified from spinach. *Plant Physiol.* 61: 373-379.
- Sauer K. (1975) Primary events and the trapping of energy. In *Bioenergetics of Photosynthesis*. Govindjee (ed.) Academic Press, San Francisco. p: 15-181.
- Schulman J. H., et Hughes A. H. (1932) On surface potentials of unimolecular films. Part IV. The effect of the underlying solution and transition phenomema in the film. *Proc. R. Soc. London Ser. A.* 138: 430-450.
- Shah D. O., et Schulman J. H. (1967) Influence of calcium, cholesterol, and unsaturation on lecithin monolayers. *J. Lipid Res.* 8: 215-226.
- Shasovnikova L. V., Los'eva O. V., et Lavrent'ev V. V. (1983) Study of the conformational stability of immunoglobulin A by the method of monomolecular layers. *Biophysics*, 28: 632-636.
- Shibata A., Kai T., Yamashita S., Itoh Y., et Yamashita T. (1985) Conformation of poly (*L*-glutamic acid) at the air/water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 812: 587-590.
- Shibata H., Ochiai H., Kawashima T., Okamoto T., et Inamura I. (1986) Preparation and properties of the water-soluble chlorophyll-bovine serum albumin complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 852: 175-182.

- Shiffer K. A., Goerke J., Düzgünes, Fedor J., et Shohet S. B. (1988) Interaction of erythrocyte protein 4.1 with phospholipids. A monolayer and liposome study. *Biochim. Biophys. Acta* 937: 269-280.
- Shipman L. L., Norris J. R., et Katz J. J. (1976) Quantum mechanical formalism for computation of the electronic spectral properties of chlorophyll aggregates. *J. Phys. Chem.* 80: 877-882.
- Siefermann-Harms D., Ninnemann H., et Yamamoto H. Y. (1987) Reassembly of solubilized chlorophyll-protein complexes in proteolipid particles. Comparison of monogalactosyldiglycerol and two phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 892: 303-313.
- Siegenthaler P.-A., Rawyler A., et Giroud C. (1987) Spatial organization and functional roles of acyl lipids in thylacoid membranes. Dans: Stumpf P. K., Mudd S. J., et Nes W. D. (Eds), *The Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids*, p: 161-168. Plenum Publishing Corporation.
- Singer S. J., et Nicholson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science* 175: 720-731.
- Stryer L. (1988) *Biochemistry*. Third edition, W. H. Freeman and Company, New York.
- Surewicz W. K., et Mantsch H. H. (1988) New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 952: 115-130.
- Surewicz W. K., Moscarello M. A., et Mantsch H. H. (1987) Secondary structure of the hydrophobic myelin protein in a lipid environment as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 262: 8598-8602.
- Szabo G. (1972) Lipid bilayer membranes. Dans: Fox C. F., et A. D. Keith (Eds) *Membrane Molecular Biology* p: 146-163. Sinauer Associates

Inc. Publishers Stamford, CO.

- Szalay, L., Singhal, G. S., Tombácz, E., et Kozma, L. (1973) Light absorption and fluorescence of highly diluted chlorophyll solutions. *Acta Phys. Acad. Sci. Hungaricae* 34: 341-350.
- Tancrède P., Chauvette G., et Leblanc R. M. (1981) General method for the purification of lipids for surface pressure studies. *J. Chromatogr.* 207: 387-393.
- Tancrède P., Munger G., et Leblanc R. M. (1982) Excess free energies of interaction of chlorophyll a with monogalactosyldiacylglycerol and phytol. A mixed monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* 689: 45-54.
- Taneva S., Panaiotov I., et Ter-Minassian-Saraga L. (1984) Effect of surface pressure on mixed dipalmitoyllecithin-serum albumin monolayer composition. *Colloids & Surfaces* 10: 101-111.
- Taylor D. M., de Olivera O. N. Jr., et Morgan J. (1990) Models for interpreting surface potential measurements and their application to phospholipid monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 139: 508-518.
- Teissie J. (1981) Interaction of cytochrome c with phospholipid monolayers. Penetration of protein as functions of the packing density of film, nature of the phospholipids, and the ionic content of the aqueous phase. *Biochemistry* 20: 1554-1560.
- Tournois H., Gieles P., Demel R., de Gier J., et de Kruijff B. (1989) Interfacial properties of gramicidin and gramicidin-lipid mixtures measured with static and dynamic monolayer techniques. *Biophys. J.* 55: 557-569.
- Turnit H. J. A. (1960) A theory and method for the spreading of protein monolayers. *J. Colloid Sci.* 15: 1-13.

- Verge R., et Pattus, F. (1982) Lipid-protein interactions in monolayers. Chem. Phys. Lipids 30: 189-227.
- Wilkinson M. C., Zaba B. N., Taylor D. M., Laidman D. L., et Lewis T. J. (1986) A monolayer study on cytochrome *b₅*-phospholipid interactions. Biochim. Biophys. Acta 857: 189-197.
- Willey D. L., Auffret A. D., et Gray J. C. (1984) Structure and topology of cytochrome *f* in pea chloroplast membranes. Cell, 36: 555-562.
- Willms I., Malkin R., et Chain R. K. (1987) Studies of the chloroplast cytochrome *b₆-f* complex incorporated into liposomes. Dans: Biggens J. (Ed) Progress in Photosynthesis Research Vol. II, p: 466-468. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Yang W. J., Griffiths P. R., Byler D. M., et Susi H. (1985) Protein conformation by infrared spectroscopy: resolution enhancement by Fourier self-deconvolution. Appl. Spectrosc. 39: 282-287.